

Verfahrensentwicklung zur mikrobiellen Herstellung von Erythrit

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Michael Tobias Bippes
aus Karlsruhe

Erster Referent: Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop

Zweiter Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang

Eingereicht am: 18.12.2006

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.05.2007

Druckjahr 2007

Danksagung

Mein Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Mit vielfältigsten Anregungen, Ideen und seiner steten Diskussionsbereitschaft hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

...der Südzucker AG für die Bereitstellung der Finanzmittel für dieses Projekt und die stets gute Zusammenarbeit. Namentlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Markwart Kunz, Herrn Dr. Wolfgang Wach und Herrn Dr. Thomas Rose für die Unterstützung bedanken.

...Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang für die Übernahme des Koreferats.

...meinen Mitarbeitern Herrn Dipl.-Biotechnol. Thomas Prade, Frau Dipl.-Biotechnol. Judith Hölzer, Frau Dipl.-Biol. Henriette Gruber, Herrn Dipl.-Ing. (FH) Lutz Uilderks, Herrn Dipl.-Ing. (FH) Patrick Lettner, Herrn cand. ing. (FH) Su Yi, Frau cand. ing. (FH) Kevser Ayyildiz. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen großen Dank für ihre wertvolle Arbeit aussprechen. Ohne sie wäre diese Arbeit wesentlich erschwert worden.

...den Mitarbeitern des Instituts für Technologie der FAL Braunschweig. Insbesondere schulde ich Herrn Dr. Ulrich Jahnz, Herrn Dr. Peter Wittlich, Herrn Dr. Ulf Prüße, Herrn Studienrat z.A. Karsten Hecht, Herrn Dipl.-Chem. Marc Schlieker und Frau Dipl.-Ing (FH) Susanne Hirschmann sowie den Mitarbeitern der Werkstatt und des Messbüros Dank für die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Tipps. Es herrschten große Hilfsbereitschaft und ein angenehmes Betriebsklima.

...Herrn Dr. Thomas Willke für die weitreichende Unterstützung bei der Analytik.

...Herrn Prof. Dr. Klaus Baganz für die tatkräftige Unterstützung bei der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung und die stete Bereitschaft zur Diskussion.

...meiner Frau Julia für ihre Geduld und Gelassenheit. Sie war mir in jeder Phase der Arbeit eine unverzichtbare Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	2
3	Stand des Wissens	3
3.1	Erythrit	3
3.2	Erythrit in Lebensmitteln	5
3.3	Erythrit in der chemischen und pharmazeutischen Industrie.....	7
3.4	Herstellung von Erythrit.....	14
3.4.1	Chemische Verfahren	14
3.4.2	Biotechnologische Verfahren.....	16
3.4.2.1	Stoffwechselweg.....	16
3.4.2.2	Osmotischer Druck und Auswirkung der Substratkonzentration...	19
3.4.2.3	Übersicht von Verfahren der Erythritproduktion.....	19
3.4.3	Zulassungssituation von Erythrit als Lebensmittelzusatz und für Pharmazeutika	25
3.5	Immobilisierung.....	26
3.5.1	Gelförmige Verkapselungsmatrizes	27
3.5.2	Hydrogele aus Calcium-Alginat.....	28
3.5.3	Hydrogele aus Polyvinylalkohol	28
3.6	Schaumbildung während der Fermentation	29
3.6.1	Grundlagen der Schaumbildung	30
3.6.2	Schaumbekämpfung.....	31
3.6.2.1	Chemische Methoden.....	31
3.6.2.2	Physikalische Methoden.....	32
3.6.2.3	Mechanische Methoden	32
4	Material und Methoden	33
4.1	Verwendeter Stamm	33
4.2	Stammhaltung.....	33
4.3	Anzucht der Biomasse	33
4.3.1	Anzucht der Vorkulturen	33
4.3.2	Anzucht der Versuchskulturen.....	33
4.4	Medienzusammensetzung.....	34
4.4.1	Standardmedium ohne Phosphat für Fermentationen und Schüttelkolbenversuche	34
4.4.2	Standardmedium mit Phosphat für Fermentationen und Schüttelkolbenversuche	34

4.4.3	Medium mit verschiedenen Kohlenhydratquellen	34
4.4.4	Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen.....	34
4.4.5	Medium mit verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen	35
4.4.6	Medium mit verschiedenen Hefeextrakt- und Ammoniumchloridkonzentrationen.....	35
4.4.7	Medium mit verschiedenen Kartoffelrestfruchtwasser-Konzentrationen	35
4.4.8	Medium mit verschiedenen Rindergülle-Konzentrationen	36
4.4.9	Medium mit verschiedenen Ribit-Konzentrationen	36
4.4.10	Medium mit verschiedenen Erythrit-Konzentrationen	36
4.4.11	Medium mit verschiedenen Ethanol-Konzentrationen	37
4.4.12	Medium mit verschiedenen Glycerin-Konzentrationen	37
4.4.13	Medium mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen	37
4.4.14	Medium mit verschiedenen Cystein-Konzentrationen.....	37
4.4.15	Medium mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen	38
4.4.16	Medium mit verschiedenen Spurenelementen.....	38
4.4.17	Medium mit verschiedener Vitamin B1-Konzentration	38
4.5	Immobilisierung.....	39
4.5.1	Immobilisierung in PVAL.....	39
4.5.1.1	Polymerlösung.....	39
4.5.1.2	Stabilisierlösung	39
4.5.1.3	Vorbereitung der Zellen	39
4.5.1.4	Herstellung von LentiKats®	39
4.5.1.5	Waschlösungen zum Waschen von LentiKats®	39
4.5.2	Immobilisierung in Calcium-Alginat.....	40
4.5.2.1	Polymerlösung.....	40
4.5.2.2	Vernetzerlösung	40
4.5.2.3	Vorbereitung der Zellen	40
4.5.2.4	Herstellung von Kugeln	40
4.6	Fermentersystem.....	40
4.6.1	Fermentationssteuerung.....	43
4.6.1.1	Temperatur.....	43
4.6.1.2	pH-Wert.....	43
4.6.1.3	Sauerstoffpartialdruck.....	43
4.6.2	Schaumbekämpfung.....	44
4.6.2.1	Schaumbekämpfungsmittelzugabe	44

4.6.2.2	Intervall-Schaumbekämpfung	44
4.6.2.3	Mechanische Schaumbekämpfung.....	44
4.7	Versuchsvorbereitung.....	47
4.7.1	Schüttelkolbenversuche.....	47
4.7.2	Fermentationen.....	47
4.8	Probenahme	47
4.8.1	Schüttelkolbenversuche.....	47
4.8.2	Fermentationen.....	48
4.9	Bestimmung der Biotrockenmasse	48
4.9.1	Bestimmung der freien Biotrockenmasse	48
4.9.2	Bestimmung der Biotrockenmasse in Ca-Alginat-Immobilisaten	48
4.10	HPLC Analytik.....	48
4.10.1	Probenvorbereitung	48
4.10.2	Kohlenhydratanalytik	49
4.10.3	Ammoniumanalytik	50
4.10.4	Nitrat- und Nitritanalytik	50
4.11	Bestimmung des pH-Wertes	50
4.12	Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks.....	51
4.13	Mikroskopische Untersuchungen.....	51
4.14	Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ	51
4.15	Bestimmung der spezifischen Produktbildungsrate π	51
4.16	Bestimmung der Ausbeute.....	52
5	Ergebnisse und Diskussion.....	53
5.1	Medienuntersuchungen	53
5.1.1	Einfluss der Kohlenstoffquelle	53
5.1.1.1	Einfluss der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	53
5.1.1.2	Substrataufnahmeverhalten.....	54
5.1.2	Einfluss der Stickstoffquelle.....	55
5.1.2.1	Einfluss unterschiedlicher Stickstoffquellen.....	55
5.1.2.2	Einfluss der Hefeextraktkonzentration	56
5.1.2.3	Stickstoffersatz im Hefeextrakt durch Ammoniumchlorid.....	58
5.1.2.4	Gülle als Substrat	59
5.1.2.5	Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) als Substrat	60
5.1.3	Einfluss von Spurenelementen und Vitaminen	64
5.1.3.1	Cu^{2+}	65
5.1.3.2	Mg^{2+}	66

5.1.3.3	Mn ²⁺	67
5.1.3.4	Fe ³⁺	68
5.1.3.5	Ca ²⁺	69
5.1.4	Vitamin B ₁	71
5.1.5	Einfluss der Schwefelquellen	72
5.1.5.1	Einfluss der Cysteinkonzentration	72
5.1.5.2	Einfluss der Sulfatkonzentration	73
5.1.6	Einfluss der Phosphatkonzentration	74
5.1.7	Einfluss von Metaboliten und Substrat	75
5.1.7.1	Erythrit	75
5.1.7.2	Ethanol	79
5.1.7.3	Glycerin	80
5.1.7.4	Ribit	81
5.2	Untersuchung physiko-chemischer Parameter	83
5.2.1	Einfluss des pH-Wertes	83
5.2.2	Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks	84
5.2.2.1	Untersuchungen im Schüttelkolben	84
5.2.2.2	Fermentation bei konstanten Sauerstoffpartialdrücken	87
5.3	Schaumbekämpfung	88
5.3.1	Konstruktion eines Schaumberegners	88
5.3.2	Schaumkontrolle über Rührerleistung	89
5.3.3	Schaumbekämpfung durch Schaumbekämpfungsmittelzugabe	89
5.3.4	Fazit der Schaumbekämpfungsmaßnahmen	89
5.4	Einfluss der Fermentergeometrie	89
5.5	Kultivierung immobilisierter Zellen	91
5.5.1	Fermentation mit LentiKats®	91
5.5.2	Fermentation mit Calcium-Alginat-Perlen	93
6	Ökonomische Betrachtungen	95
6.1	Situationsbeschreibung	95
6.2	Verfahrensfließbild	95
6.3	Ermittlung der Herstellkosten	98
6.3.1	Vorkultur	98
6.3.2	Produktionsfermentation	98
6.3.3	Biomasseabscheidung	99
6.3.4	Eindampfung	99
6.3.5	Kristallisation	99

6.3.6	Allgemeines	100
6.3.7	Berechnung der Herstellkosten.....	100
6.4	Untersuchung der Herstellkosten.....	103
6.4.1	Jahreskosten	103
6.4.2	Verbrauchskosten.....	104
6.4.3	Kapitalkosten	105
6.4.4	Personalkosten	106
6.4.5	Sensitivitätsuntersuchung.....	106
6.4.5.1	Rohstoffpreise	107
6.4.5.2	Energiekosten.....	108
6.4.5.3	Fermentervolumen	109
6.4.5.4	Fermentationszeit	110
6.4.5.5	Ausbeute	111
6.4.5.6	Produktkonzentration bei konstanter Ausbeute	113
7	Zusammenfassung	114
7.1	Medienuntersuchung	114
7.2	Einfluss physiko-chemischer Parameter sowie Schaumbekämpfung	115
7.3	Einfluss der Fermentergeometrie.....	116
7.4	Immobilisierung.....	116
7.5	Ökonomische Betrachtungen.....	117
8	Anhang.....	118
8.1	Geräte.....	118
8.1.1	Analytik	118
8.1.2	Mikrobiologische Arbeiten.....	118
8.1.3	Sonstige.....	118
8.2	Chemikalien	119
8.3	Software.....	119
8.4	Sonstige.....	119
8.5	Programmierung	119
9	Literaturliste	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1	Abhängigkeit der Löslichkeit von der Temperatur von Mannit, Palatinit, Erythrit, Maltit, Xylit, Sorbit und Saccharose.	5
Abbildung 3-2	Sensorisches Rad von Erythrit und Saccharose.	6
Abbildung 3-3	Strukturformel von Tetranitroerythrit	8
Abbildung 3-4	Herstellung von Tetraoxadecalin und seinen Isomeren aus Erythrit und Threit	9
Abbildung 3-5	Herstellung von cis/trans-1,4-Anhydroerythrit und hieraus Polyurethanelastomere und „rigid chain“ Polyester	9
Abbildung 3-6	Bildung von Polyethererythrit durch Kondensationsreaktion und daraus Herstellung von Polyethererythritpolyurethan	10
Abbildung 3-7	Herstellung von Folgeprodukten aus cis-1,4-Anhydroerythrit	10
Abbildung 3-8	Herstellung von Dioxinderivaten und bityklischen Dioxanen aus Erythrit und zyklischen α -Hydroxyketonen	11
Abbildung 3-9	Herstellung von Aza- und Thioderivaten von Erythrit	11
Abbildung 3-10	Oxidation von Erythrit an Platin zu Erythrose, Erythulose und Erythritsäure	12
Abbildung 3-11	Herstellung von Phenylboronsäureestern mit Erythrit und als Nebenprodukte gebildete Dioxane	12
Abbildung 3-12	Gallussäure und Tetra-galloyl-meso-erythrit	13
Abbildung 3-13	Erythrit als Vorstufe für 1,3,4-Butantriol und 4-Amino-3-hydroxy-Buttersäureketon	13
Abbildung 3-14	Herstellung von D,L-Threit aus Erythrit	14
Abbildung 3-15	Mannosylerythritlipid	14
Abbildung 3-16	Herstellung von Erythrit aus Buten-2-diol-1,4	14
Abbildung 3-17	Herstellung von Erythrit aus Dialdehydstärke	15
Abbildung 3-18	Herstellung von Erythrit durch Reduktion von Dialkylweinsäureester	15
Abbildung 3-19	Herstellung von Erythrit und Threit durch Hydrierung von Weinsäure	15
Abbildung 3-20	Stoffwechselnetzwerk von SZ 101 unter Einbeziehung der Glycolyse und des Pentosephosphatwegs sowie der zellinternen Substratumwandlung	18
Abbildung 4-1	RI-Fließbild der Fermenteranlage nach DIN 28004	41
Abbildung 4-2	Schaumberegner in schematischer Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts oben). Die blauen Pfeile geben die relative Bewegungsrichtung der Flüssigkeit an. Das Bild rechts unten zeigt den auf der Rührerachse montierten Beregner.	45
Abbildung 4-3	Typisches HPLC-Diagramm	49

Abbildung 5-1	Verlauf der Einzelsubstrate und der Glucoseäquivalente. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	55
Abbildung 5-2	Auswirkungen unterschiedlicher Hefeextraktkonzentrationen auf die Erythritbildung. Nicht gezeigt: 100 g/L und 250 g/L Hefeextrakt. Versuchsbedingungen nach 4.4.5, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	57
Abbildung 5-3	Einfluss des Stickstoffaustauschs in Hefeextrakt durch Ammoniumstickstoff. Versuchsbedingungen nach 4.4.6, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	58
Abbildung 5-4	Auswirkungen von verschiedenen Güllekonzentrationen auf die Produktbildung. (a) Erythritkonzentration, (b) Ausbeute, (c) Produktivität. Versuchsbedingungen nach 4.4.8, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	60
Abbildung 5-5	Auswirkungen unterschiedlicher Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrationen auf die Produktbildung. (a) Erythritkonzentration, (b) Ausbeute, (c) Produktivität. Versuchsbedingungen nach 4.4.7, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	61
Abbildung 5-6	Fermentation mit PNC-Medium in der Satellitenfermentereinheit: Die Produktbildungs- und die Wachstumsparamter (e, g) sind nur bis zum Zeitpunkt der Zufütterung ermit-telt. Versuchsbedingungen nach 4.4.7 (55 g/L), pH nicht korrigiert, T=33 °C, 120 UpM.	63
Abbildung 5-7	Einfluss der Cu^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	66
Abbildung 5-8	Auswirkung der Mg^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	67
Abbildung 5-9	Auswirkung der Mn^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	68
Abbildung 5-10	Auswirkung der Fe^{3+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	69
Abbildung 5-11	Auswirkung der Ca^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	70
Abbildung 5-12	Auswirkung der Vitamin B ₁ -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	71
Abbildung 5-13	Einfluss der Cysteinkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.14, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	73
Abbildung 5-14	Auswirkung der Sulfatkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.15, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	74
Abbildung 5-15	Einfluss der Kaliumdihydrogenphosphatkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.13, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	75
Abbildung 5-16	Auswirkung der Erythrit- und Saccharosekonzentration auf das Produktbildungsverhalten. Versuchsbedingungen nach 4.4.10, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	77
Abbildung 5-17	Schüttelkolben im fed-batch Verfahren. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	79

Abbildung 5-18	Auswirkung der Ethanolkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.11, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	80
Abbildung 5-19	Auswirkung der Glycerinkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.12, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	81
Abbildung 5-20	Einfluss der Ribitkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.9, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	82
Abbildung 5-21	Auswirkung des initialen pH-Wertes auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	84
Abbildung 5-22	Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Erythritbildung mit SZ 101. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	86
Abbildung 5-23	Fermentation bei konstantem Sauerstoffpartialdruck. Versuchsbedingungen nach 4.4.2, pH konstant bei 5,5, T= 33 °C, 120 UpM	87
Abbildung 5-24	Einfluss der Fermentergeometrie auf den Sauerstoffpartialdruck und das Produkt-bildungsverhalten. Versuchsbedingungen nach 4.4.2, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	91
Abbildung 5-25	Fermentation mit in LentiKats® immobilisierten Zellen. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	92
Abbildung 5-26	In den Fermentationen mit unterschiedlicher Biomassebeladung im Satelliten-fermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Versuchsbedingungen nach 4.4.1 mit 15 g/L Hefeextrakt, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.	94
Abbildung 6-1	Grundfließbild zur fermentativen Herstellung von Erythrit nach DIN 28004	96
Abbildung 6-2	Verfahrensfließschema für die industrielle Herstellung von Erythrit nach DIN 28004	97
Abbildung 6-3	Relativer Anteil der Kostengruppen an den Herstellkosten	103
Abbildung 6-4	Anteil der Kostengruppen Rohstoffe und Energie und Hilfsmittel an den Verbrauchskosten	104
Abbildung 6-5	Relativer Anteil der einzelnen Rohstoffe an den Rohstoffkosten	104
Abbildung 6-6	Relativer Anteil der einzelnen Energiearten und Hilfsmitteln an Energiekosten und Hilfsmitteln	105
Abbildung 6-7	Relativer Anteil der einzelnen Komponentengruppen an den Kapitalkosten	106
Abbildung 6-8	Einfluss des Saccharosepreises auf die Herstellkosten von Erythrit	107
Abbildung 6-9	Einfluss des Hefeextraktpreises auf die Herstellkosten von Erythrit	107
Abbildung 6-10	Einfluss des Kaliumdihydrogenphosphatpreises auf die Herstellkosten von Erythrit	108
Abbildung 6-11	Einfluss des Dampfpreises auf die Herstellkosten von Erythrit	109
Abbildung 6-12	Einfluss des Stompreises auf die Herstellkosten von Erythrit	109

Abbildung 6-13	Einfluss des Fermentervolumens auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Anzahl der benötigten Reaktoren zur Erreichung der Mindestjahresproduktion	110
Abbildung 6-14	Einfluss der Fermentationszeit auf die Herstellkosten von Erythrit. Oben in der Abbildung die Anzahl der benötigten Reaktoren zur Erreichung der Mindestjahresproduktion	111
Abbildung 6-15	Auswirkung der Erythritkonzentration bei konstanter Substratkonzentration auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Produktausbeute bezogen auf Saccharose (w/w)	112
Abbildung 6-16	Auswirkung der Substratkonzentration bei konstanter Produktkonzentration auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Produktausbeute bezogen auf Saccharose (w/w)	112
Abbildung 6-17	Auswirkung der Veränderung der Produkt- und Substratkonzentration bei konstanter Ausbeute auf die Herstellkosten von Erythrit	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Stoffdaten von Erythrit und anderen Zuckeraustauschstoffen im Vergleich	4
Tabelle 3-2	Brennwertreduzierung in Lebensmitteln durch den Ersatz von Saccharose, Glucose und Fructose durch Erythrit.	6
Tabelle 3-3	Fermentative Verfahren zur Herstellung von Erythrit	21
Tabelle 3-4	Übersicht über Verfahren zur Anreicherung und zur Erzeugung von Mutanten zur Erythritherstellung	23
Tabelle 3-5	Stand der aktuellen und beantragten Zulassungen von Erythrit in Lebensmitteln	25
Tabelle 3-6	Durch Schäume in Bioprozessen auftretende Probleme	29
Tabelle 4-1	Standardmedium ohne Phosphat	34
Tabelle 4-2	Standardmedium mit Phosphat	34
Tabelle 4-3	Medium mit verschiedenen Kohlenhydratquellen	34
Tabelle 4-4	Medium mit unterschiedlichen Stickstoffquellen	35
Tabelle 4-5	Medium mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen	35
Tabelle 4-6	Medium mit verschiedenen Hefeextrakt und Ammoniumchloridkonzentrationen	35
Tabelle 4-7	Medium mit verschiedenen Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrationen	36
Tabelle 4-8	Medium mit verschiedenen Konzentrationen separierter Rindergülle	36
Tabelle 4-9	Medium mit verschiedenen Ribitkonzentrationen	36
Tabelle 4-10	Medium mit jeweils verschiedenen Erythrit und Saccharosekonzentrationen	36
Tabelle 4-11	Medium mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen	37
Tabelle 4-12	Medium mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen	37
Tabelle 4-13	Medium mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen	37
Tabelle 4-14	Medium mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen	38
Tabelle 4-15	Medium mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen	38
Tabelle 4-16	Medium mit verschiedenen Spurenelementlösungen	38
Tabelle 4-17	Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin B ₁	39
Tabelle 4-18	Technische Maße des Schaumberegners und eingesetzte Stoffwerte	45
Tabelle 4-19	Reibungszahlen isotherm-stationärer Turbulenzströmung in glatten Rohren nach [279].	46
Tabelle 4-20	Für die angegebenen Modelle berechnete Parameter	46
Tabelle 4-21	Komponenten des verwendeten HPLC-Analytiksystems.	49

Tabelle 4-22	Komponenten des verwendeten HPLC-Analytiksystems für die Untersuchung von Nitrat und Nitrit.	50
Tabelle 5-1	In den Ansätzen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	54
Tabelle 5-2	In den Ansätzen mit verschiedenen Stickstoffquellen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	56
Tabelle 5-3	In den Ansätzen mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	57
Tabelle 5-4	In den Ansätzen mit verschiedenen Ammonium- und Hefeextraktkonzentrationen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	59
Tabelle 5-5	In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an separierter Rindergülle erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	60
Tabelle 5-6	In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	62
Tabelle 5-7	In der Fermentation mit Kartoffelrestfruchtwasser erreichte Produktkonzentration und Ausbeute. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	64
Tabelle 5-8.	In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Cu^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	66
Tabelle 5-9.	In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Mg^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	67
Tabelle 5-10.	In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Mn^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	68

- Tabelle 5-11. In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Fe^{3+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 69
- Tabelle 5-12 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ca^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 70
- Tabelle 5-13 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ribit (4.4.4) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 72
- Tabelle 5-14 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Cystein erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 73
- Tabelle 5-15 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumsulfat erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 74
- Tabelle 5-16 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an KH_2PO_4 erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 75
- Tabelle 5-17 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Erythrit erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die gebildete Erythritkonzentration und die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Gebildetes Erythrit bezeichnet das zusätzlich zum bereits im Medium enthaltene gebildete Erythrit. Zur Berechnung der absoluten Erythritkonzentration ist dieser Wert zur Konzentration des vorgelegten Erythrits zu addieren. 78
- Tabelle 5-18 In der Kultivierung im fed-batch erreichte Produktkonzentration und Ausbeut. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 79
- Tabelle 5-19 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ethanol erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 80
- Tabelle 5-20 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Glycerin erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. 81
- Tabelle 5-21 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ribit (4.4.4) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen

der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	82
Tabelle 5-22 In den Ansätzen mit verschiedenen pH-Werten erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	84
Tabelle 5-23 In den Ansätzen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration	86
Tabelle 5-24 In den verschiedenen pO_2 -Stufen im Master-Fermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	88
Tabelle 5-25 In den verschiedenen Fermentersystemen erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.	91
Tabelle 5-26 In den verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Biomassebeladungen im Satelliten-Fermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen des Nebenprodukts Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Der Biotrockenmassegehalt bezieht sich auf den Gesamtgehalt, der sich aus freier Biomasse und Biomasse im Immobilisat zusammensetzt.	94
Tabelle 6-1 Komponentenliste für eine Produktionsanlage mit einer Jahreskapazität von 5.000 t sowie Auflistung der zugehörigen Leistungsaufnahme der Einzelkomponenten	101
Tabelle 6-2 Zusammenfassung der wichtigsten Daten einer Produktionsanlage zur Herstellung von Erythrit (5.700 t/a) und Ermittlung der Herstellkosten	102

Abkürzungen und Symbole

Abkürzung / Symbol	Einheit	Bedeutung
η	[mPas]	Viskosität
λ	[-]	Reibungszahl
μ	[1/h]	Spezifische Wachstumsrate
ξ	[-]	Widerstandszahl
π	[1/h]	Spezifische Produktbildungsrate
ρ	[kg/m ³]	Dichte
ω	[1/s]	Winkelgeschwindigkeit
Δ	-	Differenz
A	[m ²]	Fläche
BTM	[g/L]	Konzentration der Biotrockenmasse
d	[m]	Durchmesser
f	[1/s]	Drehzahl, Frequenz, Umdrehungen pro Sekunde
g	[m/s ²]	Erdbeschleunigung
h	[h]	Stunde
H	[m]	Höhe
HPLC	-	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
k. A.	-	keine Angaben verfügbar
l	[m]	Länge
lg	-	dekadischer Logarithmus
ln	-	natürlicher Logarithmus
m	[kg]	Masse
min	[min]	Minute
p	[Pa]	Druck
P	[g/L]	Konzentration des Produkts
pO ₂	[%]	Sauerstoffpartialdruck
r	[m]	Radius
Re	[-]	Reynoldszahl
S	[m]	Eintauchtiefe
T	[h, min]	Zeit
UpM	[1/min]	Drehzahl, Umdrehungen pro Minute
V	[m/s]	Geschwindigkeit
V	[m ³]	Volumen
X	[g/L]	Konzentration der Biomasse
Y	[% (w/w)]	Ausbeute

1 Einleitung

Die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen zum Ersatz von petrochemischen Erzeugnisse wird in Zukunft eine zunehmende Rolle spielen. Eine Vielzahl an Produkten, die heute grundsätzlich herstellbar sind, scheitern entweder an der Verfügbarkeit der Rohstoffe in größerem Maße oder an deren Preis. Diese Grundstoffe sind über eine chemische Synthese nur unter großem Aufwand und damit sehr kostspielig oder auf Grund von stereochemischen Verhältnissen gar nicht zugänglich. Eine gangbare Alternative stellt hierbei die fermentative Herstellung dieser Grundstoffe aus pflanzlichen nachwachsenden Rohstoffen dar.

Saccharose ist die weltweit in größter Menge hergestellte organische Verbindung mit einem Jahresvolumen von insgesamt 136,8 Millionen Tonnen Weißzuckerwert im Jahre 2004. Von der erzeugten Zuckermenge entfallen ungefähr 24 % auf Rübenzucker.

Mit dem Wegfall der EU-Zuckermarktordnung und dem Import von billigem Zucker zu Weltmarktpreisen wird die Marge für die Zuckerindustrie in Europa an Verzehrzucker ein negatives Ergebnis verzeichnen. Die Suche nach alternativen Anwendungsfeldern für Saccharose – sowohl als Weißzucker als auch in den Vorstufen und Melasse – wird daher immer dringlicher. Die neuen Einsatzfelder für Produkte aus Zucker sollen mehrere Bedingungen erfüllen: die Produktion muss wirtschaftlich erfolgen, es muss ein Marktsegment für das hergestellte Produkt geben, die Anwendungspalette für das Produkt muss möglichst breit und als Vorläuferchemikalie für anderen Produkte verwendbar sein und das Produkt muss möglichst in größerer Menge benötigt werden. Vorteilhaft wäre zudem die mögliche Nutzung von bestehenden Anlagen der Zuckerindustrie und die Übertragung vorhandenen Wissens auf die Herstellung des neuen Produktes. Als mögliche Produkte bieten sich hierbei organische mono- und bifunktionelle Säuren (z.B. Itaconsäure, Citronensäure, Bernsteinsäure) sowie mono- und polyfunktionelle Alkohole (z.B. Ethanol, 2,3-Butandiol, Propandiol, Erythrit) sowie Zuckerester (Saccharosenitrate und – acetate) an.

Erythrit bietet sich in diesem Umfeld als vielseitiger Grundstoff an. Die Einsatzgebiete von Erythrit erstrecken sich sowohl in den Bereich der Lebensmittel, der Pharmazie, der Kunststoffherstellung sowie als Vorläuferchemikalie für weitere Produkte. Erythrit kann sowohl als Zuckeraustauschstoff alleine als auch in Mischungen mit Süßstoffen und anderen Zuckeralkoholen in Lebensmitteln als Zuckeraustauschstoff zum Einsatz kommen. Aus Erythrit können mittels Biokonversion oder direkter chemischer Oxidation das Monoaldehyd (Erythrose) und das Monoketon (Erythrulose) erzeugt werden. Weiterhin ist die Umwandlung von Erythrit in Threit in einer Cofermentation möglich. Durch chemische Modifizierungen sind weitere interessante Vorstufen herstellbar.

Sowohl der Lebensmittelbereich als auch der Einsatz als Monomere für Kunststoffe versprechen einen hohen Absatz an Erythrit.

2 Zielsetzung

Zur biotechnologischen Herstellung von Erythrit verspricht die Fermentation des Pilzes SZ 101 gute Ausbeuten bei hoher Produktivität und Selektivität [1]. Um Erythrit für die Industrie als Rohstoff ökonomisch interessant zu machen, muss der Herstellungsprozess auch in Bezug auf mögliche Probleme mit Nebenprodukten, Substrat- und Produkthemmung als auch Schaumbildung deutlich verbessert werden. Des Weiteren werden detaillierte Informationen zu den Wachstumsbedingungen des Organismus benötigt, um den biotechnischen Prozess reproduzierbar zu machen. Hierbei spielt vor allem der Sauerstoffbedarf des Pilzes SZ 101 eine große Rolle. Eine Immobilisierung kann biotechnische Prozesse in ihrer Rentabilität durch erhöhte Produktivität und vereinfachte Aufreinigung des Produktes konkurrenzfähig machen. Hierfür werden Daten über den Einfluss der Immobilisierung in verschiedenen Matrices benötigt.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb folgende Aspekte behandelt werden:

- Untersuchungen zur Medienoptimierung für den Pilz SZ 101
- Untersuchungen zur Beeinflussung des Nebenproduktspektrums
- Untersuchungen zum Sauerstoffeinfluss
- Untersuchungen zur Schaumbekämpfung bei der Fermentation
- Untersuchungen zum Einfluss der Immobilisierung

Nach Durchführung dieser Arbeiten ist eine Produktionsanlage zur Herstellung von Erythrit zu konzipieren und die Herstellkosten von Erythrit sind zu ermitteln.

3 Stand des Wissens

3.1 Erythrit

Erythrit (1,2,3,4-Butantetrol) ist das optisch inaktive meso-Isomer des Threits. Es ist in vielen natürlichen Organismen zu finden, sowohl in Reinform als auch in gebundener Form. Die ersten Isolate wurden in Flechten [2;3;4] und der Algen [5;6] gefunden. Weitere Fundorte sind in Melone, Birne und Trauben [7], in Apfelsinen [2], in Speisepilzen [8;9], in Sake (Reiswein) [10;11], in Wein [12;13], in Sojasauce [14], in Miso-Suppe und -paste (fermentierte Bohnensuppe und -paste) [15], in mit Pilzen beimpften Käsen [16], in Samenflüssigkeit von Mensch und Tier [17;18;19], in Urin [20;21], in Rückenmark- und Hirnflüssigkeit [22], in Augenlinsengewebe [23;24;25], Fruchtwasser von Damwild [26] und in Tierblut [23;24] zu finden.

Erythrit ist in Wasser leicht löslich, in Ethanol wenig löslich und in Ether unlöslich [2]. Die chemischen Eigenschaften von Erythrit sind ähnlich denen anderer Zuckeralkohole wie Glycerin, Xylit und Mannit; ihnen allen ist das Fehlen von reduzierenden (End-)Gruppen gemein. Wie alle Zuckeralkohole schmeckt Erythrit süß, weist jedoch im Vergleich zu den anderen ein saubereres und klareres Geschmacksbild auf, das dem der Saccharose stark gleicht. Erythrit weist eine gute Thermo- und pH-Stabilität auf und liegt als Feststoff in geruchslosen, wasserfreien Kristallen vor [27]. Aufgrund der geringen Molmasse verursacht Erythrit in Lösung einen hohen osmotischen Druck. Die damit verbundene verminderte Wasseraktivität macht Erythrit zu einem guten Konservierungshilfsstoff. Lösungen von Erythrit sind zudem von geringer Viskosität [27]. Im menschlichen Körper wird Erythrit fast vollständig über den Zwölffingerdarm absorbiert und über die Nieren ausgeschieden, so dass hohe Mengen an Erythrit ohne negative Folgen für die Verdauung verzehrt werden können. Die Flora des menschlichen Rachenraumes kann Erythrit nicht verstoffwechseln, so dass der Verzehr von erythrit-haltigen Nahrungsmitteln nicht die Bildung von Karies fördert. Der Blutzucker- und Insulinspiegel wird durch den Konsum von Erythrit nicht beeinflusst.

Die Konformationszustände von Erythrit in der Gasphase wurden durch theoretische Berechnungen beschrieben [28]. Theoretische Berechnungen zur Aufklärung und Unterscheidung der Süßestrukturen von Erythrit und Threit ergaben, dass Erythrit eine höhere relative Süße als Threit hat [29]. Erythrit wurde durch Infrarotspektroskopie [30] sowie durch Röntgenbeugungsanalyse [31;32] und Neutronenbeugungsanalyse [33] untersucht sowie die Gitterenthalpie und die Wasserstoffbrückenbindungsenthalpie [34] und die Bindungswinkel innerhalb des Moleküls [33] berechnet.

Physikalische und chemische Stoffdaten zu Erythrit sowie anderen Zuckeralkoholen und Saccharose sind in der nachfolgenden Tabelle abgebildet [2;35].

3 Stand des Wissens

Tabelle 3-1 Stoffdaten von Erythrit und anderen Zuckeraustauschstoffen im Vergleich

		Erythrit	Threit	Xylit	Mannit	Sorbit	Maltit	Palatinit	Lactit	Saccharose
Kohlenstoff	[n°]	4	4	5	6	6	12	12	12	12
Molmasse	[g/mol]	122	122	152	182	182	344	344	344	342
Physiol. Brennwert	[kcal/g] ¹	0,2	k.A.	2,4	1,6	2,6	2,1	2,0	2,0	4,0
Süße [relativ zu Saccharose]		0,7	k.A.	1,0	0,4-0,5	0,4-0,5	0,9	0,45	0,3	1,0
Kühlungseffekt	[-]	kühl	k.A.	sehr kühl	kühl	kühl	nein	nein	wenig kühl	nein
Schmelzpunkt	[°C]	120	78 o. 90 ²	94	166-168	95	150	145-150	122	190
Glasübergangstemperatur	[°C]	53,3	k.A.	46,5	40,0	43,5	34,5	35,5	k.A.	32,0
Lösungsenthalpie	[J/g]	-180,2	k.A.	-152,9	-119,4	-108,9	-79,2	-39,4	-58,2	-18,0
Temperaturstabilität	[°C]	>160	k.A.	>160	>160	>160	>160	>160	>160	160
pH-Stabilität	[-]	2-10	k.A.	2-10	2-10	2-10	2-10	2-10	>3	hydrolysiert
Partielles molares Volumen in wässriger Lösung	[cm³/mol]	86,83	k.A.	102,12	119,22	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Axiale Länge	[Å]	8,0-9,3	k.A.	9,6-9,9	10,1-10,7	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Maximaler Durchmesser	[Å]	3,1-3,2	k.A.	3,2-3,3	3,4	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Viskosität		sehr niedrig	k.A.	sehr niedrig	niedrig	mittel	mittel	hoch	sehr niedrig	niedrig
Hygroskopizität		sehr niedrig	k.A.	hoch	niedrig	mittel	mittel	niedrig	mittel	mittel
Löslichkeit [% w/w bei 25 °C]		37	k.A.	64	20	70	60	25	57	67
Löslichkeit [% w/w bei 50 °C]		55	k.A.	80	31	83	70	45	74	72
	auf Blutzucker-/ Insulinhaushalt	ohne	k.A.	klein	klein	klein	wahrs. gering	wahrs. gering	ohne	mäßig groß
Wirkung	Kariogenität	-	k.A.	-	+	+	-	k. A.	-	+
	Laxation	-	k.A.	+	+	+	+	++	++	-

Der Wasserdampfdruck über einer wässrigen Lösung von Erythrit ist dem von Xylit und Sorbit sehr ähnlich. Alle Monosaccharidzuckeralkohole haben jedoch einen etwa dreifach höheren Wasserdampfdruck als Saccharose [36]. Die Löslichkeit von Erythrit nimmt mit der Temperatur stark zu. Der Kurvenverlauf ähnelt dem von Isomalt, verläuft jedoch oberhalb dieser Kurve. Sorbit, Xylit und Maltit sowie Saccharose weisen anfänglich deutlich höhere Löslichkeiten auf (Abbildung 3-1) [37]. Die verminderte Löslichkeit von Erythrit bei niedrigen Temperaturen begünstigt eine Kühlungskristallisation.

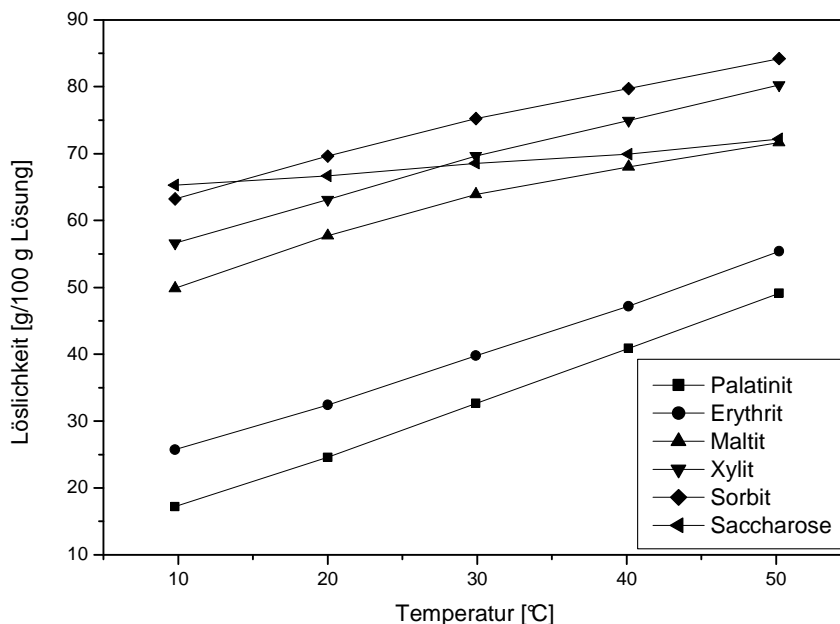


Abbildung 3-1 Abhängigkeit der Löslichkeit von der Temperatur von Mannit, Palatinit, Erythrit, Maltit, Xylit, Sorbit und Saccharose.

3.2 Erythrit in Lebensmitteln

Erythrit stellt als Vertreter der vierten Generation von Zuckeraustauschstoffen nach Sorbit (erste Generation), Isomalt (zweite Generation) und Alvéosweet (dritte Generation) deren konsequente Weiterentwicklung dar [38]. In der Nahrungsmittelindustrie, vor allem in den USA und Japan, wird Erythrit als Zuckeraustauschstoff für diätetische Lebensmittel mit reduziertem Kaloriengehalt eingesetzt. Bei etwa 70 % relativer Süßkraft im Vergleich zu Saccharose weist es nur 5 % des Brennwertes des normalen Haushaltszuckers auf. Das Geschmacksbild von Erythrit ist dem der Saccharose sehr ähnlich (siehe Abbildung 3-2) [37]. Erythrit eignet sich daher zum Ersatz von Saccharose in Lebensmitteln.

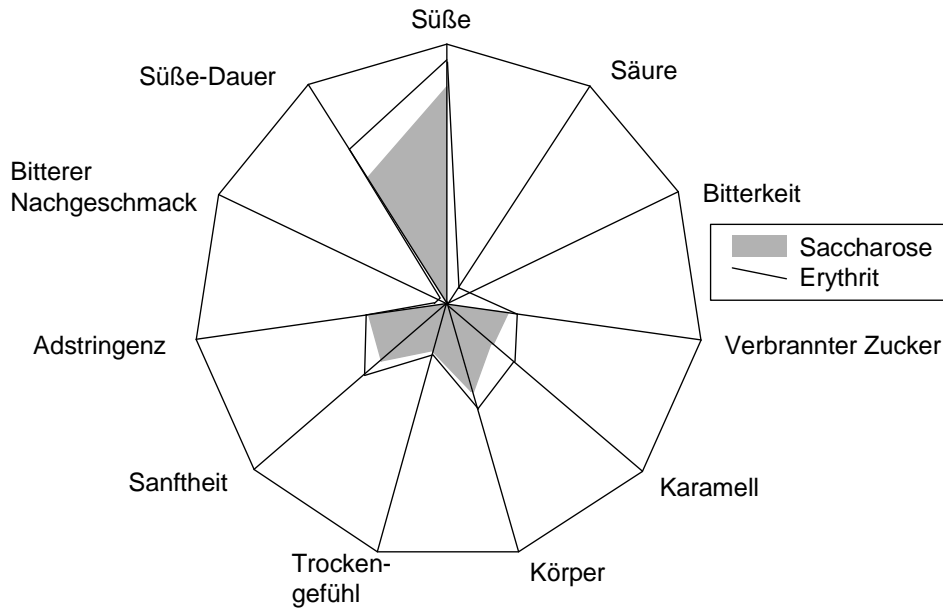


Abbildung 3-2 Sensorisches Rad von Erythrit und Saccharose.

Aufgrund des geringeren Molekulargewichts werden ca. 90 % des aufgenommenen Erythrits bereits im Dünndarm resorbiert und innerhalb 24 Stunden im Urin ausgeschieden, ohne dass es zur Verwertung kommt [39;40]. Erythrit findet unter anderem Anwendung in Kakaopulver [41], Schokolade [42;43;44;45], Konfekt [46], Glasuren [47;48], gefüllte Hartkaramellen [49;50], in Chiffonkuchen [51] und Kaugummi [52;53]. In gesüßten Getränken wird Erythrit nicht nur als Süßungsmittel, sondern auch wegen seines kühlenden Geschmackserlebnisses eingesetzt [54;55;56;57;58;59;60].

Durch den Ersatz von Saccharose, Glucose und Fructose ganz oder teilweise in Lebensmittel lassen sich die im folgenden aufgeführten Einsparungen des physiologischen Brennwertes erzielen [61]:

Tabelle 3-2 Brennwertreduzierung in Lebensmitteln durch den Ersatz von Saccharose, Glucose und Fructose durch Erythrit.

Anwendung	Brennwertreduktion [%]
Tafelsüße	90
Hartkaramellen	90
Kaugummi	85
Komprimat	85
Fondant	65
Buttercreme	36
Schokolade	34
Creme-Backmischungen	31
Biskuit	25

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Veresterung von Erythrit mit Fettsäuren zur Herstellung von verzehrbaren oberflächenaktiven Substanzen [62;63;64;65;66]. Anwendung findet sich auf dem japanischen Markt als Zuschlagstoff für die Herstellung von Fertiggrührteigkuchen. Hierdurch soll dem Kuchen eine luftige Konsistenz verliehen werden. Die Umsetzung der Substrate erfolgt mittels einer Lipase im organischen Lösemittel in einer reversed-phase Reaktion. Weiterhin werden vollständig veresterte Erythrit-Fettsäureester hergestellt, die gut verarbeitbare, bei Raumtemperatur feste Fette sind, für den Körper jedoch nicht

verwertbar sind und auch kein „anal-leakage“ (eine unkontrolliert austretender dünnflüssiger Fettstuhl) verursachen [67]. Eine Vielzahl an Fettsäure-Erythritpartialestern wurde hergestellt und physiko-chemisch charakterisiert, jedoch keiner Verwendung zugeordnet [68].

Maltosylerythrit, hergestellt durch enzymatische Transglykosylierung von Erythrit mit *Bacillus stearothermophilus*, ist als Ersatz von Saccharose in Lebensmitteln interessant, da es Dextranucrase und Mutansucrase in ihrer Aktivität unterdrückt und somit die Bildung von Karies wirkungsvoll unterdrücken kann [69].

Die aufgenommene Menge an Erythrit je Einwohner aus natürlichen Quellen (hauptsächlich Käse und Wein) in den Vereinigten Staaten wird auf 80 mg/d (entsprechend 1,3 mg/kg Körpergewicht/d), in Japan auf 46 mg/d bzw.

0,7 mg/kg Körpergewicht/d geschätzt. Für die Vereinigten Staaten wird geschätzt, dass für 90 % der Bevölkerung eine zusätzliche Aufnahme von ungefähr 4 g/d (67 mg/kg Körpergewicht/d) je Einwohner zusätzlich durch die Beimengung von Erythrit zu Lebensmitteln zu erwarten ist [70].

3.3 Erythrit in der chemischen und pharmazeutischen Industrie

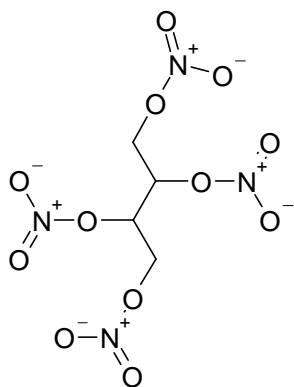
Erythrit besitzt eine Vielzahl an Anwendungsfeldern in denen es direkt oder als Derivat angewendet werden kann und stellt somit einen wichtigen Building-block für die chemische und pharmazeutische Industrie dar [71].

Die Verwendung von Erythrit in der pharmazeutischen Technik zum Überziehen von Medikamenten durch Sprühcoating verspricht viele Vorteile, da Erythrit nicht mit anderen Inhaltsstoffen Wechselwirkungen zeigt und sich durch seine physiko-chemischen Eigenschaften wie hohe Wasserlöslichkeit, niedrige Hygroskopizität, spontane Kristallisation und niedrige Klebkraft [72] auszeichnet. In der Herstellung von Trockenpulvern für die lungengängige Inhalation von Glucagon ist Erythrit erfolgreich verwandt worden [73].

Durch die Verwendung von Erythrit wird die Herstellung von besonders rasch löslichen Pillen möglich, die sich jederzeit und ohne Wasser zur Einnahme von Medikamenten verwenden lassen. Insbesondere richtet sich dieses Verfahren zur Verabreichung von Medikamenten an Kinder und ältere Menschen [74].

Erythrit ist Ausgangsstoff zur Herstellung von Tetranitroerythrit durch Nitrierung (Abbildung 3-3) [75]. Ähnlich dem Nitroglycerin kann diese Substanz als Therapeutikum für Angina Pectoris bzw. wird als Sprengstoff eingesetzt werden [61].

Es wurde durch Infrarotanalyse untersucht [76] und die seine Auswirkung von auf den Elektronentransport und die Phosphorylierung in Lebergewebe wurden untersucht [77]. Die Gleichgewichtskonstanten der Nitrierung von Erythrit wurden bestimmt [78].



Tetranitroerythrit

Abbildung 3-3 Strukturformel von Tetranitroerythrit

Die Beimengung von Erythrit als Plastifizierungshilfsmittel zu Chitosan-Amylose-Stärkefilmen erhöht deren Flexibilität gegenüber Filmen ohne Erythrit. Die mit Erythrit hergestellten Filme besitzen auch eine erhöhte Dehnbarkeit gegenüber Filmen mit Glycerin, Sorbit oder ohne Polyolbeimischung [79].

Bei der Herstellung von optoelektronischen Vorrichtungen wie LEDs und photovoltaischen Zellen auf Polymerbasis mit Poly(3,4-Ethylendioxythiophenen):Poly(styrolsulfonat) (PEDOT:PSS)-Filmen erhöht sich die Leitfähigkeit dieser Filme durch die Beimischung von Erythrit um zwei Größenordnungen. Bausteine, die mit solchen Filmen als Anode ausgerüstet sind, weisen fast die gleiche Leistungsfähigkeit wie Filme mit Anoden aus Indium-Zinn-Oxid auf und eröffnen somit die Möglichkeit, Anoden aus Indium-Zinn-Oxid abzulösen [80].

Die Herstellung von Latentwärmespeicher, die im Temperaturbereich von 80 – 100 °C arbeiten, benötigen Materialien, die nicht korrosiv, kostengünstig in der Herstellung und nicht umweltschädlich oder gesundheitsschädlich sind. Erythrit kann diese Anforderungen erfüllen, indem es in reiner Form in einem Latentwärmespeicher [81] oder in Mischung mit 60 % Trimethylolethan [82] zur Energiespeicherung eingesetzt werden kann. Anwendungsgebiete sind Warmwasserbereitstellung für den Heimbereich oder die schnelle Erwärmung von Motorölen.

Aus Erythrit kann in einer Kondensationsreaktion mit Formaldehyd in sauerem Milieu *trans*- 1,3,5,7-Tetraoxadecalin (TOD) hergestellt werden, die *cis*-Isomere sind über Threit zugänglich. Diese bilden die Grundlage für eine neue und interessante Klasse von Macrocyclen und Kryptanden (Abbildung 3-4) [83]. Bei dieser Reaktion können jedoch auch andere bizyklische Dioxanderivate entstehen.

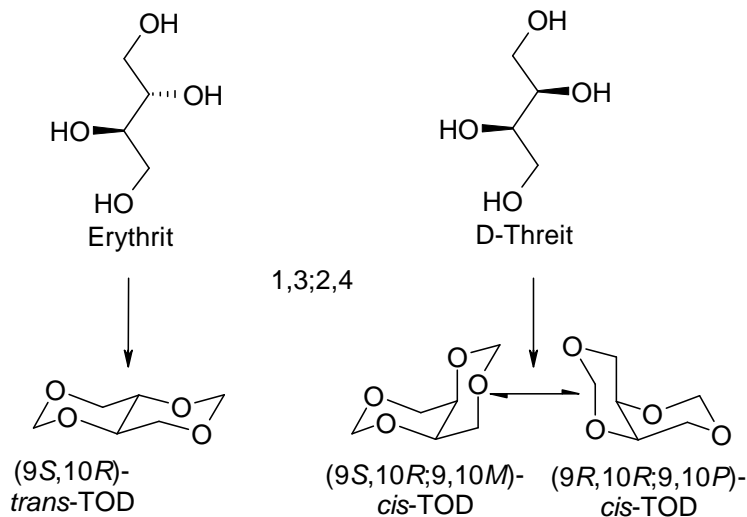


Abbildung 3-4 Herstellung von Tetraoxadecalin und seinen Isomeren aus Erythrit und Threit

Durch die säurekatalysierte intramolekulare Kondensationsreaktion von Erythrit entsteht das flüssige zyklische Diol 1,4-Anhydroerythrit [84;85], eine weitere Möglichkeit ist die Dehydratisierung an Zeoliten [86]. Dieses kann sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation vorliegen. 1,4-Anhydroerythrit kann sowohl zur Herstellung von „rigid-chain“-Polyestern und Polyurethanelastomere [87;88;89] als auch von Epoxydharzen [90] verwandt werden. 1,4-Anhydroerythrit kann in 3,4-Diaminotetrahydrofuran umgesetzt werden, dieses dient zur Synthese von Polyamiden mit chlorigen Dicarboxysäuren (Abbildung 3-5) [91]. Die Ringöffnungspolymerisation von *cis*-2,3-Dimethoxy-1,4-anhydroerythrit führt zu Bildung von Polyoxydimethoxatetramethylen [92].

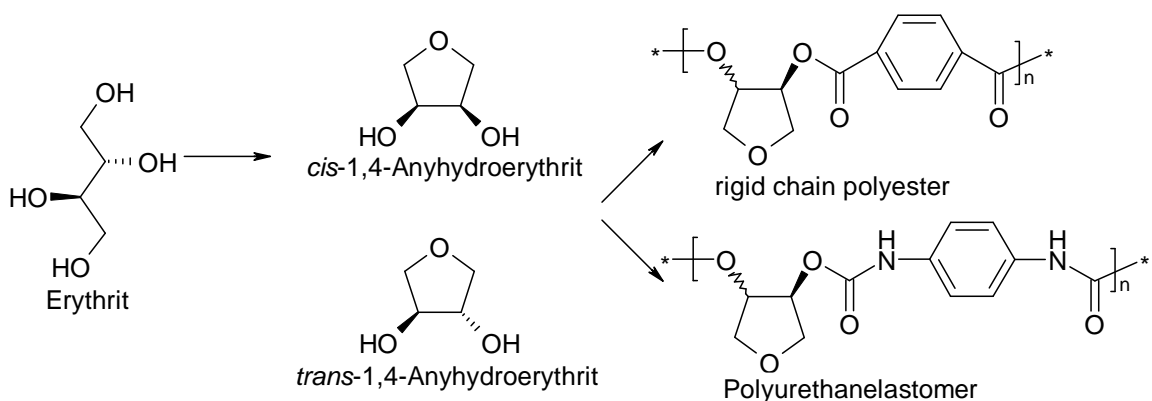


Abbildung 3-5 Herstellung von cis/trans-1,4-Anhydroerythrit und hieraus Polyurethanelastomere und „rigid chain“ Polyester

Erythrit kann chemisch-synthetisch in Polymere, Feinchemikalien und pharmazeutische Wirkstoffe oder deren Vorstufen umgesetzt werden. Der Einsatz in Polymeren kann direkt als Monomer oder nach Polymerisation zu Polyethererythrit eingesetzt werden. Eine direkte Umsetzung von Erythrit führt zu Polyestern und Alkydharzen, die Umsetzung von Polyethererythrit führt zu Polyurethanschäumen und Polyethererythritestern, die als Tenside [93] dienen können (Abbildung 3-6). Erythrit selbst kann als Additiv wie ein Stabilisatoren oder Plastizier für die Veredlung von Stärken und Cellulosen verwandt werden. Erythrit konkurriert in

diesem Feld mit anderen Polyolen wie Glycerin, Pentaerythrit und Sorbit, die günstiger sind.

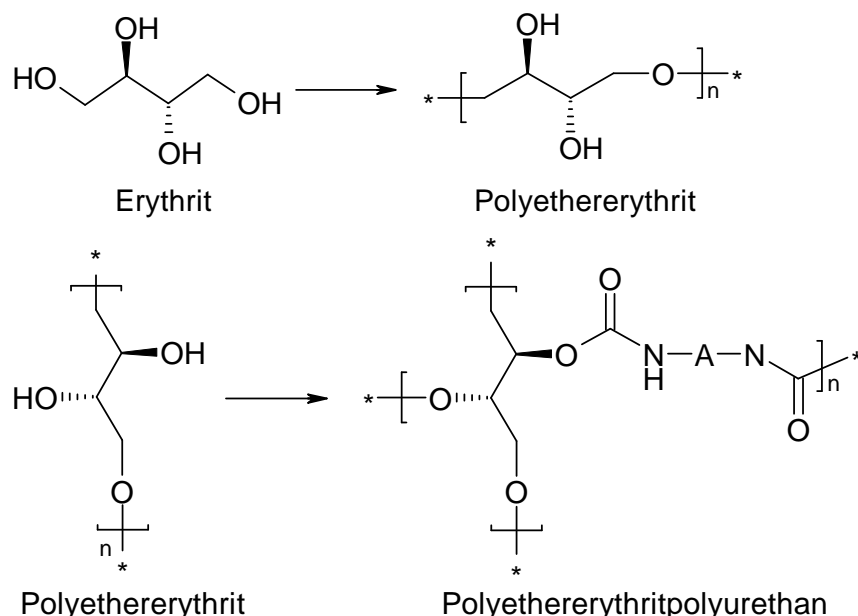


Abbildung 3-6 Bildung von Polyethererythrit durch Kondensationsreaktion und daraus Herstellung von Polyethererythritpolyurethan

Als Spezialadditive, dielektrische Materialien oder dipolare aprotische Lösungsmittel können 1,4-Anhydroerythritformal und -carbonat verwandt werden. 1,4-Anhydroerythritdialkylether zeigen Potenzial als Lösungsmittel für elektrische Isolatoren mit interessanten dielektrischen Eigenschaften (Abbildung 3-7) [61].

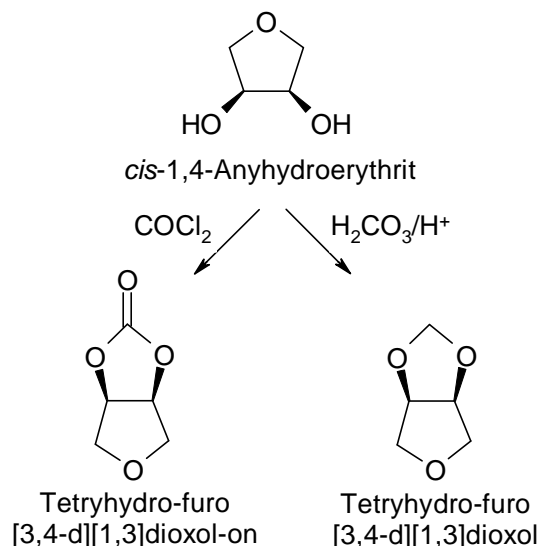


Abbildung 3-7 Herstellung von Folgeprodukten aus cis-1,4-Anhydroerythrit

Die Umsetzung von zyklischen α -Hydroxyketonen mit Erythrit erzeugt Bis(dihydrodioxin)-Derivate in guten Ausbeuten [94]. Das Dioxanderivat trans-2,5-di-(1,2-Dihydroxyethyl)-1,4-Dioxan kann durch die säurekatalysierte Dehydratation von zwei Erythritmolekülen mit intramolekularer Wasserabspaltung gebildet werden. Dieses Produkt kann als Nebenprodukt der Herstellung von 1,4-Anhydroerythrit aus

Erythrit unter bestimmten Voraussetzungen auftreten [95]. Weitere Dioxanderivate aus Erythrit und Formaldehyd wurden hergestellt, es handelt sich um multizyklische Dioxansysteme mit 5,6,7 und 12 Kohlenstoffatomen (Abbildung 3-8) [96].

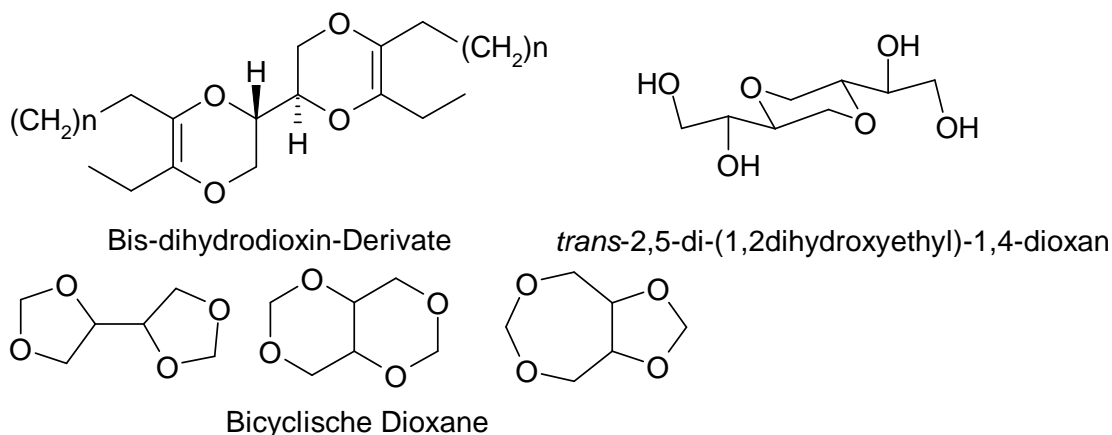


Abbildung 3-8 Herstellung von Dioxinderivaten und bityklischen Dioxanen aus Erythrit und zyklischen α -Hydroxyketonen

Erythrit kann zuerst in ein biszyklisches Sulfatderivat umwandelt werden und von da aus in durch einen nukleophilen Angriff mit Allylamin oder Natriumsulfit in die Heterozyklen Aza- oder Thioanhydrodeoxyalditole umgewandelt werden (Abbildung 3-9) [97;98].

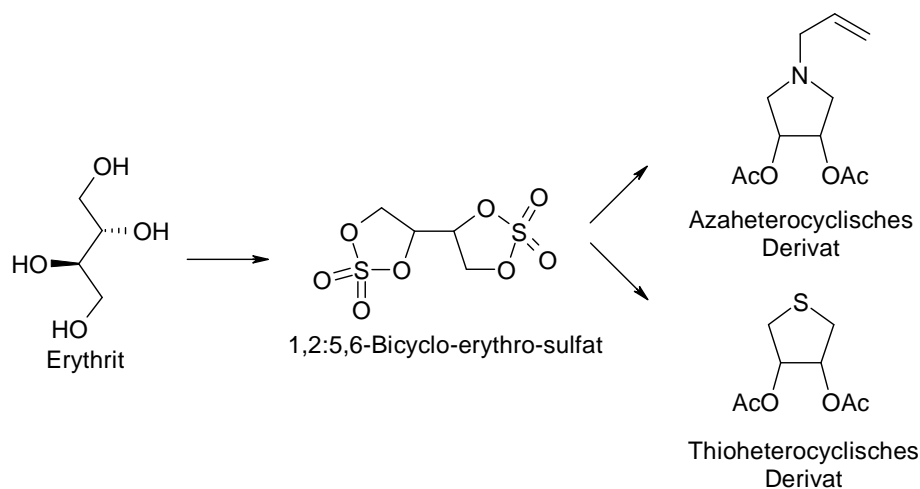


Abbildung 3-9 Herstellung von Aza- und Thioderivaten von Erythrit

Durch Elektrooxidation an Platin in saurem Milieu ist die Herstellung von Erythrose, Erythrose und Erythrinsäure aus Erythrit möglich (Abbildung 3-10) [99]. Erythrinsäure ist zudem ohne die Bildung von Nebenprodukten durch eine Oxidation an Ru^{3+} -Katalysatoren durch *N*-Bromoacetamid zugänglich [100]. Durch den Einsatz von Quecksilberacetat können bei Erythrit und Threit die sekundären Hydroxylgruppen ganz oder teilweise in Ketogruppen umgewandelt werden [101]. Alle Produkte dienen als Vorläufersubstanzen für Feinchemikalien und Pharmazeutika.



The diagram illustrates the equilibrium between a cyclic boronate ester and its open-chain form, and three bicyclic dioxane structures.

Top Row: A cyclic boronate ester (left) is in equilibrium with its open-chain form (right). The cyclic form is a six-membered ring with two oxygen atoms and a boron atom bonded to a phenyl group (BPh). The open-chain form is a linear structure with two phenylboronate groups (PhB-O) and a central carbon atom bonded to two oxygen atoms.

Middle Row: Three bicyclic dioxane structures are shown, representing different conformations or isomers of the bicyclic dioxane system.

Bottom Row: The label "Bicyclische Dioxane" is centered below the three structures.

Die Ester der Gallussäure [103] stellen eine im Pflanzenreich weit verbreitete Substanzklasse [103;104] dar. Sie sind von wesentlicher Bedeutung für den Selbstschutz der Pflanzen [105] und finden Verwendung in der Nahrungsmittelherstellung [106], der Kunststoffindustrie und in der Lederverarbeitung [107;108]. In jüngster Zeit wurde ihre biologische Funktion als Antioxidans [109;110;111], als Mittel gegen Krebsentstehung [112;113] und als Mittel gegen Mutagenese [114] erforscht. Insbesondere in der Leder verarbeitenden Industrie gibt es große Bemühungen, die gängigen Cr^{3+} -Salze durch alternative, umweltfreundlichere Mittel zu ersetzen. Erythrit lässt sich mit Gallussäure vollständig verestern. Es stellt damit einen interessanten Weg zum Ersatz von Chromsalzen dar (Abbildung 3-12) [115]. Die Wirksamkeit von Erythrit-Gallussäure-Estern in den genannten Anwendungsfeldern steht zu untersuchen.

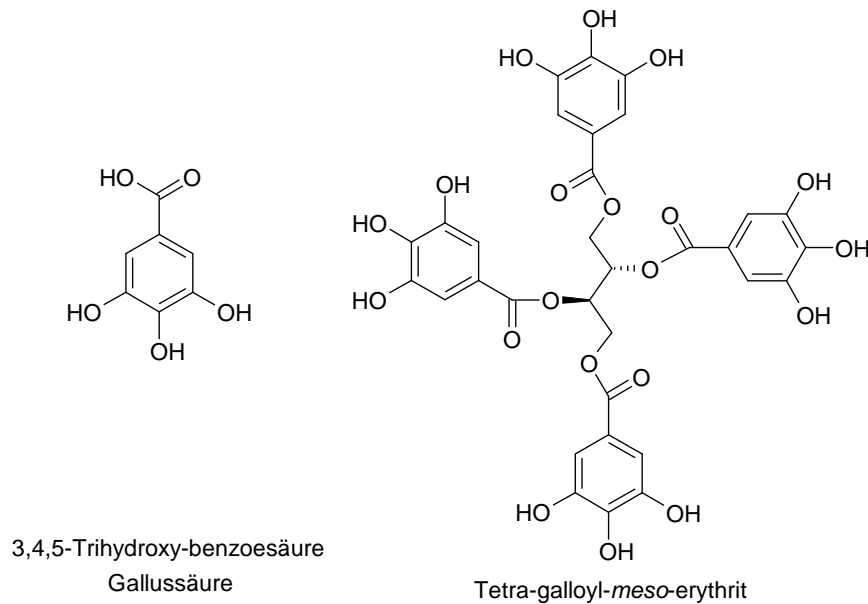


Abbildung 3-12 Gallussäure und Tetra-galloyl-meso-erythrit

Auch in mikrobiologischen Prozessen wird Erythrit als Substrat eingesetzt. Bei der aeroben Umsetzung durch *Gluconobacter* entsteht Erythrulose [116]. Dieses wird unter anderem als Bräunungsmittel [117;118] eingesetzt und dient als Vorstufe für weitere Veredelungen zu 4-Amino-3-hydroxy-2-keto-butansäure und 1,2,4-Butantriol (Abbildung 3-13). Erythrulose hat weiterhin Bedeutung als Vorstufe für die Herstellung von Biotin, Swainsonin, Anamarin, (-)-Argentiolacton, (+)-Goniothalmin und (+)-Tupilapin [119;120].

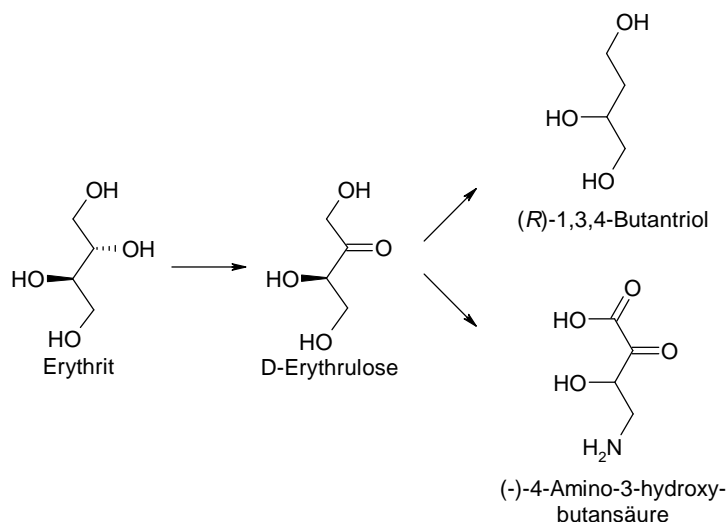


Abbildung 3-13 Erythrit als Vorstufe für 1,3,4-Butantriol und 4-Amino-3-hydroxy-Buttersäureketon

Durch eine Kofermentation von Erythrit mit Saccharose oder Fructose durch z.B. *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacia*, *B. caryophylli*, *B. andropogoni* oder *Agrobacterium tumefaciens* entsteht Threit (Abbildung 3-14) [121], welches als Ausgangssubstanz für Cytostatika wie Treosulfan [122;123;124;125], Tetrabutratester [126], 1,4-Dithiothreit und Benzylthreit bildet. Threit kann wie Erythrit in Latentwärmespeichern Verwendung finden [127], da sein Schmelzpunkt für den Temperaturbereich um 80 °C ideal geeignet ist.

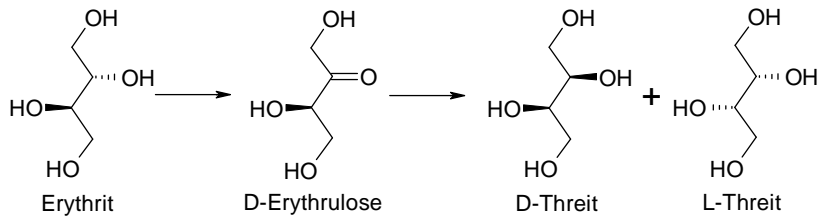


Abbildung 3-14 Herstellung von D,L-Threitol aus Erythrit

Erythrit wird als Substrat in der Bildung von Mannosylerythritlipiden (MEL) durch Fermentation mit z.B. *Pseudozyma aphidis* eingesetzt (Abbildung 3-15) [128]. MEL werden zur Behandlung von Schizophrenie und Erkrankungen des Dopaminstoffwechsels [129], zur Aufreinigung von Proteinen [130;131] oder als Antiagglomerantien in Eiskristallschlämmen [132].

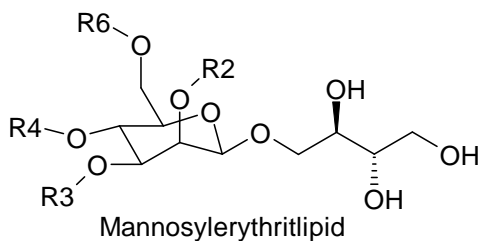


Abbildung 3-15 Mannosylerythritlipid

3.4 Herstellung von Erythrit

3.4.1 Chemische Verfahren

Es existieren mehrere chemische Syntheseprozesse, die zur Herstellung von Erythrit in der Industrie angewendet werden oder wurden.

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Erythrit besteht in der Reaktion von Chlor mit Buten-2-diol-1,4 in wässrigem Alkalicarbonat. Das entstandene Erythrit-2-chlorhydrin wird in alkalischer Natriumcarbonatlösung verseift. Dieses Verfahren hat gegenüber der Herstellung von Erythrit aus Buten-2-diol-1,4 über Bromierung, Abspaltung von Bromwasserstoff und Überführung des Butadiendioxyds mit Wasser in Erythrit den Vorteil einer einfacheren Prozessführung, des niedrigeren Preises und der besseren Ausbeute (Abbildung 3-16) [133].

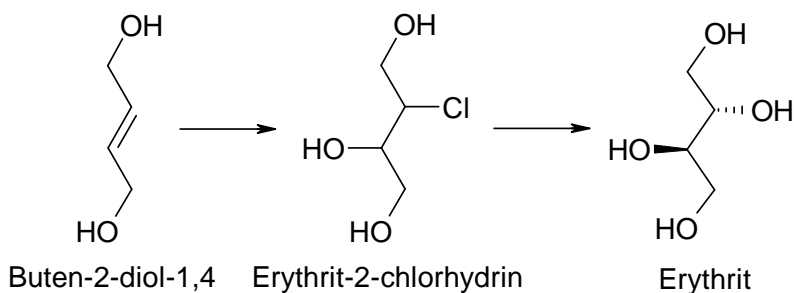


Abbildung 3-16 Herstellung von Erythrit aus Buten-2-diol-1,4

Ausgehend von Stärke als Rohmaterial wird Dialdehydstärke durch Spaltung mit Periodat erzeugt [134]. In der anschließenden Reaktion wird die Dialdehydstärke durch hydrogenolytische Spaltung in Erythrit und Ethylenglycol gespalten. Es entsteht ein äquimolares Gemisch von Erythrit und Ethylenglycol (Abbildung 3-16) [135;136]. Durch die ungünstigen Prozessbedingungen der Dialdehydstärkeherstellung (elektrochemische Regeneration des Periodates und Verlust an Periodat) war der Prozess gegenüber Fermentationsprozessen nicht wirtschaftlich. 1993 wurde Erythrit durch Japan Carlit zum Preis von 17,90 EUR/kg hergestellt [61].

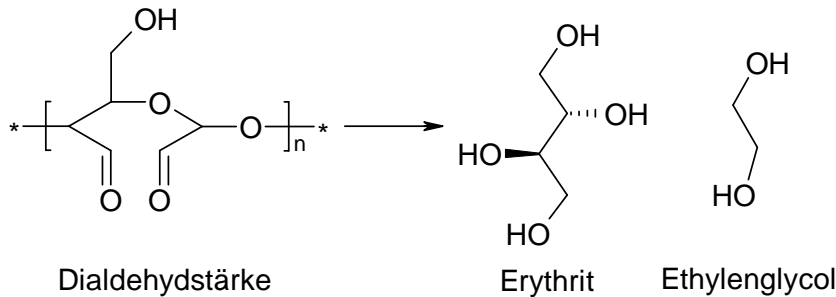


Abbildung 3-17 Herstellung von Erythrit aus Dialdehydstärke

Die Herstellung von Erythrit aus Dialkylestern von Weinsäure wird durch die Reduktion an Kupfer-Chrom-Oxid Katalysatoren möglich gemacht [137]. Durch die Hydrierung des Esters entsteht Erythrit und der entsprechende Alkylalkohol im doppelten molaren Verhältnis zu Erythrit (Abbildung 3-17).

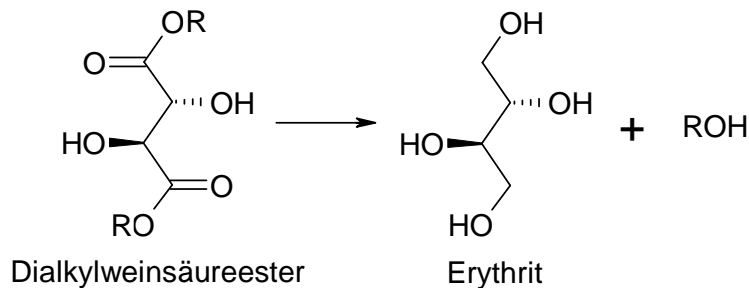


Abbildung 3-18 Herstellung von Erythrit durch Reduktion von Dialkylweinsäureester

Die Hydrierung von Weinsäure durch Raney-Nickel-Katalysatoren ergibt ein Gemisch aus Erythrit und D,L-Threit. Dieses Gemisch kann in seine Bestandteile getrennt werden oder katalytisch zu Erythrit isomerisiert werden (Abbildung 3-19) [138].

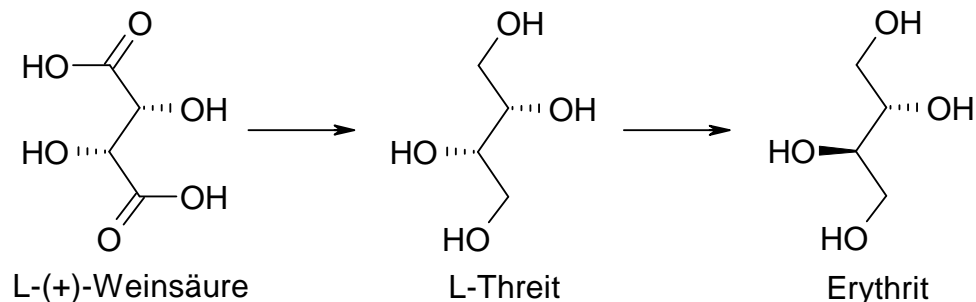


Abbildung 3-19 Herstellung von Erythrit und Threit durch Hydrierung von Weinsäure

3.4.2 Biotechnologische Verfahren

Die Herstellung von Erythrit durch Mikroorganismen ist zu Beginn der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts mit einer Reihe von osmophilen Pilzen und Hefen beschrieben worden [139]. In der folgenden Zeit wurden eine Vielzahl an Organismen gefunden, die in der Lage sind, Erythrit zu bilden [140;141;142;143;144].

3.4.2.1 Stoffwechselweg

Mikrobiell kann Erythrit durch Hefen und Bakterien hergestellt werden. Der Stoffwechselweg zur Biosynthese von Erythrit mit Hefen ist in allen Fällen der Pentosephosphatweg. Die Herstellung von Erythrit durch Bakterien liefert so geringe Erträge, dass eine wirtschaftliche Produktion aussichtslos ist.

Der Pentosephosphatweg ist in den oxidativen Abschnitt und den nichtoxidativen Abschnitt unterteilt. Das bekannte Schlussglied bildet Erythrose-4-Phosphat. Um von diesem Zwischenprodukt zu Erythrit zu gelangen, muss noch mittels einer Phosphatase dephosphoryliert und mit einer Aldosereduktase hydriert werden. Es stehen zwei mögliche Abläufe zur Wahl: zuerst wird Erythrose-4-phosphat dephosphoryliert und die entstandene Erythrose hydriert oder zunächst wird Erythrit-4-phosphat hydriert und das entstandene Erythrit-1-phosphat dephosphoryliert. Eine Suche in Enzymdatenbanken deckt Enzyme auf, die beide Wege möglich erscheinen lassen. Untersuchungen an osmophilen Hefen, die zur Erythritproduktion kommerziell eingesetzt werden, haben gezeigt, dass in diesen Organismen Erythrosereduktasen vorliegen. Durch sie wird aus Erythrose Erythrit unter Verbrauch von $\text{NADH} + \text{H}^+$ erzeugt [145;146;147;148;149;150]. Aus diesem Grund muss Erythrose-4-phosphat zuerst dephosphoryliert werden. Erst danach kann die entstandene Erythrose in Erythrit umgewandelt werden.

Die Umwandlung von Erythrose in Erythrit mittels Erythrosereduktase stellt für den Organismus eine wichtige Reaktion dar. Eine defekte Erythrosereduktase würde weitreichende Konsequenzen auf das gesamte Stoffwechselnetzwerk des Organismus haben.

Ist der Organismus nicht in der Lage, Erythrose auszuschleusen oder über andere Stoffwechselwege abzubauen, so wird die Erythrosekonzentration so lange ansteigen, bis das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist. Zum einen würde sich der Metabolit Erythrose anhäufen und die Reaktion würde bei Erreichen einer Hemmkonzentration keine Neubildung von Erythrose mehr zuzulassen, da das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist. Der gesamte nachfolgende Stoffwechselweg wird dadurch gehemmt und die Substrate müssen über alternative Stoffwechselwege entsorgt werden. Ein möglicher alternativer Stoffwechselweg ist die Reaktion von Erythrose-4-phosphat mit Xylose-5-phosphat durch eine Transketolase zu Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Glycerinaldehyd-3-phosphat kann zu Ethanol und Glycerin umgesetzt werden, Fructose-6-phosphat kann nach teilweisem oder vollständigem Durchlaufen der Glycolyse ebenfalls zu Ethanol und Glycerin umgesetzt werden.

Weiterhin kann, da Erythrose nicht mehr in Erythrit umgewandelt werden kann, das $\text{NADH} + \text{H}^+$ nicht mehr in NAD^+ umgewandelt werden. Um dem Stoffwechsel nicht auf Dauer entzogen zu werden, muss der Kofaktor also über alternative Stoffwechselwege regeneriert werden. Da zugleich alternative Stoffwechselwege zur Energiegewinnung beschritten werden müssen und der Stoffwechsel wie oben in Richtung Erythrit blockiert ist, stünde also auch die oben beschriebene Möglichkeit der Erzeugung von Glycerin und Ethanol offen.

Liegt in der Zelle ein hoher Spiegel an NADPH vor, so wird das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und damit der gesamte oxidative Zweig des

Pentosephosphat-Zyklus gehemmt. Dies bedeutet weiterhin, dass die Produktivität an Erythrit sinkt und dass die überschüssigen Reduktionsäquivalente an anderer Stelle im Stoffwechsel in NADP^+ umgewandelt werden müssen. Möglich ist hierbei die Bildung von Glycerin und Ethanol, die aus dem in der Glycolyse entstehenden Zwischenstufen Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat entstehen können.

Eine vollständig defekte, ganz oder teilweise gehemmte Erythrosereduktase sorgt also für ein Absinken der Erythritbildung. Dieses Enzym stellt somit einen wichtigen Ansatzpunkt zur genetischen Verbesserung eines Erythrit bildenden Organismus dar. In der nachfolgenden Abbildung 3-20 wird der Stoffwechselweg der Erythritbildung für Pilze abgebildet. Hierbei werden sowohl die Bildung des Produktes als auch der Nebenprodukte in Betracht gezogen. Es ist jedoch nicht geklärt, wie das Substrat vom Organismus aufgenommen wird, der in der Abbildung gezeigte Aufnahmemechanismus ist jedoch wahrscheinlich und konnte durch eigene Untersuchungen untermauert werden.

Die Bildung von Erythrit ist an die Bildung der Biomasse gekoppelt. Es liegt also ein wachstumsgekoppelter Prozess vor. Pilze als Eukaryonten verfügen über einen wesentlich komplexeren Stoffwechsel als prokaryontische Bakterien. Ein Biomassewachstum zieht daher nicht zwangsläufig die Erythritausschüttung nach sich, wie es bei einem bakteriellen Metabolismus zu erwarten wäre. Die Energiegewinnung in Pilzen kann sowohl über den Pentosephosphatweg als auch über die Glycolyse und daran angeschlossen den Citronensäurezyklus oder die Vergärung erfolgen.

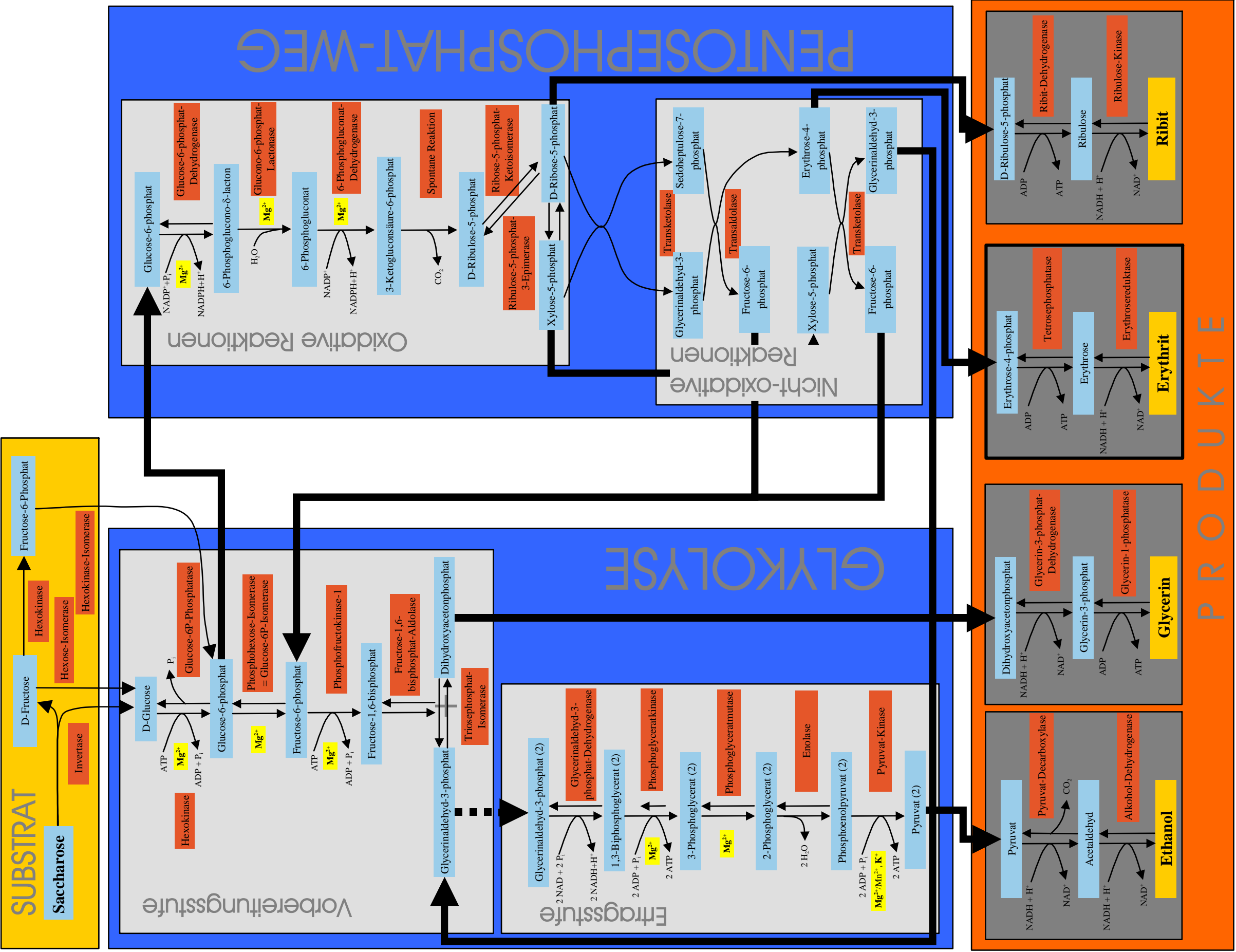


Abbildung 3-20 Stoffwechselnetzwerk von SZ 101 unter Einbeziehung der Glycolyse und des Pentosephosphatwegs sowie der zellinternen Substratumwandlung

3.4.2.2 Osmotischer Druck und Auswirkung der Substratkonzentration

Die Bildung von Erythrit erfolgt als Reaktion gegenüber dem hohen osmotischen Druck des umgebenden Mediums sowie zur Energiegewinnung. Die Zelle ist bestrebt, im Gleichgewicht mit ihrer Umgebung zu stehen. Möglich ist daher die Abgabe von Wasser aus dem Zellinneren an die Umgebung, um dadurch die interne Teilchenkonzentration zu erhöhen und das umgebende Medium zu verdünnen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, das umgebende Medium als Substrat zu verstoffwechseln und dadurch im Zellinnern Osmolyte anzuhäufen und durch die Verminderung der osmotisch wirksamen Teilchen im umgebenden Medium einen Gleichgewichtszustand zu erreichen [151;152]. Die Bildung von Erythrit erfüllt zwei Zwecke, den der Energiegewinnung und den der Osmoprotektion.

Das Vorhandensein von hohen Zuckerkonzentrationen hat verschiedene Auswirkungen auf das Medium und damit auch auf die Mikroorganismenzelle. Mit steigender Zuckerkonzentration sinkt die Sauerstofflöslichkeit im Medium, gleichsam steigt die Viskosität an. Dies bedeutet einen schlechteren Sauerstoffübergang zu den Zellen. Schlechte Sauerstoffversorgung ist ein in der Mikrobiologie häufig beschriebener Tatbestand, der bei Hefen zur Umstellung des Stoffwechsels von oxidativem Stoffwechsel (über den Pentosephosphatweg oder den Tricarbonsäurezyklus) auf anaeroben Gärungsstoffwechsel führt [153;154].

In Gegenwart von gelösten Stoffen sinkt die Wasseraktivität einer Lösung, d.h. die Menge an frei verfügbarem Wasser nimmt ab [2]. Da die Wechselwirkungen unterschiedlicher Stoffe mit Wasser sehr unterschiedlich sind, ist die Wasseraktivität von Lösungen gleicher Molarität fast immer unterschiedlich. Tabellen und Umrechnungsformeln sind jedoch für unterschiedliche Stoffe erstellt worden [155;156]. Bei verminderter Wasseraktivität ist das Wachstum von Mikroorganismen eingeschränkt. Für die technische Anwendung bedeutet dies, dass die Gefahr einer Kontamination mit steigender Substratkonzentration abnimmt.

Als Reaktion auf einen erhöhten osmotischen Druck bilden viele Pilze Polyole, insbesondere Glycerin, als Osmolyten zur Stabilisierung des Zellinnendrucks. Mit zunehmendem osmotischen Druck steigt die Bildung der Polyole. Die Bildung dieser Nebenprodukte mindert die Ausbeute und erhöht die Kosten für die Aufarbeitung, da die anderen gebildeten Polyole ähnliche physiko-chemische Eigenschaften wie Erythrit haben.

3.4.2.3 Übersicht von Verfahren der Erythritproduktion

Die verschiedenen Verfahren der Erythritherstellung lassen sich an Hand einiger Punkte unterscheiden:

- Substratquelle (Kohlenwasserstoff, Kohlenhydrat)
- Erzeugung von osmotischem Stress (Salz, Kohlenhydrat)
- Mikroorganismus (Hefe, Pilz, Bakterium)
- Prozessführung (batch, fed-batch, repeated batch und continuous culture)
- Reaktorform (Rührkessel, Blasensäule, Schüttelkolben)
- Immobilisierungsmethode

In den nachfolgend aufgeführten Verfahren werden maximale Erythritkonzentrationen von 250 – 300 g/L in einer fed-batch Fermentation im 4 m³-Maßstab erreicht. Dieser Wert ist jedoch nur einmal berichtet worden [157] und im Vergleich zu den anderen Verfahren sehr hoch.

Die maximal erreichten Ausbeuten betrugen 68,4 % (w/w) [158]. Dieser Wert ist *beachtlich* hoch und erreicht fast das theoretische Maximum von 68,7 %. Dieses Patent stellt die einzige Quelle dar, in der Erythritausbeuten mit einem Kohlenhydrat

als Substrat eine Ausbeute von mehr als 53 % erzielt werden. Untersuchungen mit diesem Stamm wurden jedoch noch nicht einem größeren Volumen durchgeführt. Die höchste jemals berichtete Produktivität betrug 2,94 g/Lh [159] und liegt damit um 20 % vor dem nächsten Verfahren. Diese Produktivität ist für die Herstellung eines Zuckeralkohols mittels osmophiler Hefen sehr gut.

Die industriell eingesetzten Verfahren verwenden fast ausschließlich Stämme, die in einem Screening selektiert wurden. Dabei kommen nur Organismen zur Verwendung, die auf Grund eines oder mehrerer spezieller Merkmale ausgewählt wurden. In der Mehrzahl sind dies Stämme, die eine gewisse Mindestkonzentration von Substrat (30 –40 % (w/w)) tolerieren sowie einen kostengünstigen komplexen Stickstoff- und Supplimentenlieferanten verwerten können (zumeist Nebenprodukte der Maisherstellung wie Maisquellwasser oder Maisquellpulver).

Die nachfolgende Tabelle 3-3 gibt einen Überblick über Literaturstellen, in denen Verfahren zur Herstellung von Erythrit beschrieben sind.

Erfüllen die Stämme nicht diese Anforderungen oder sollen sie weiter optimiert werden, so kommen Mutationsverfahren, gekoppelt mit einem Screeningverfahren, zum Einsatz. Ziel dieser Arbeiten ist zumeist die Erzeugung von Mutanten mit hoher und schneller Produktbildung. Als Methoden werden mutagene Chemikalien und UV-Strahlung verwandt.

In Tabelle 3-4 sind Verfahren aufgelistet, mit denen Mutanten von bekannten Erythritbildnern erfolgreich erzeugt wurden.

Tabelle 3-3 Fermentative Verfahren zur Herstellung von Erythrit

	Autor	Jahr	Organismus	Erythrit [g/L]	Betrieb	Dauer [h]	T [°C]	pH [-]	Produktivität [g/Lh]	Y(P/S) [% (w/w)]	Nebenprodukte	Produktionsmedium
[160]	Hajny, G.J. et al.	1964	Torula ?	37	Schüttelkolben, Batch	168	30	k.A.	0,22	45,6	k.A.	35,7 % Glucose, 1,0 % Maisquellwasser, 0,17 % Harnstoff
[161]	Dezeeuw, J.R. und Tynan, E.J.	1973	Candida lipolytica ATCC 20341	111	Schüttelkolben, Batch, 200 UpM	216	25	3,5		n.d	12,9 g/L D-Mannitol, 0,2 g/L D-Arabit	4 mL/20 mL gemischte n-Alkane (10% n-C ₁₄ H ₃₀ , 42% n-C ₁₅ H ₃₂ , 22% n-C ₁₆ H ₃₄ , 12% n-C ₁₇ H ₃₆ , 6% n-C ₁₈ H ₃₈), 2 g/L Harnstoff, 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 g/L CaSO ₄ ·2 h ₂ O, 0,5 g/L (NH ₄) ₂ PO ₄ , 0,5 g/L K ₂ SO ₄ , 0,25 g/L MgSO ₄ ·7 h ₂ O, 2,5 mg FeSO ₄ ·7 h ₂ O, 10 mg/L MnSO ₄ ·H ₂ O
[162]	Hattori, K. und Suzuki, T.	1974	Candida zeylanoides Mutante KY 6166	55	Schüttelkolben, 220 UpM, Batch	120	30	2,7-3,6	0,46	55	~5 g/L Mannit, ~20 g/L Zitronensäure	10 % (w/v) n-Alkan (C16), 2,0 % NaCl, 0,3 % Hefeextrakt, 8 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 % KH ₂ PO ₄ , 0,05 % MgSO ₄ ·7 h ₂ O, 0,05 % MnSO ₄ ·5 h ₂ O, 2 mg/L, ZnSO ₄ ·7 h ₂ O 7 mg/L, CuSO ₄ ·5 h ₂ O 50 µg/L, Thiaminhydrochlorid 1,0 mg/L (sterilfiltriert)
[163]	Ishizuka, H. et al.	1989	Aureobasidium sp. SN-G42	175	Jar Fermenter, Batch, 1000 UpM	96	35	5,4 - 4,1	1,82	47,6	Glycerin als Zwischenprodukt	40 % Glucose, 2,0 % Hefeextrakt
[164]	Bisping, B. et al.	1989	Aspergillus niger Stamm 836		BS, Batch, 3 % Calciumalgenat	k.A.	k.A.	k.A.	0,3	k.A.	1,6 g/Ld Glycerin	20 % Saccharose
[165]	Horikita, H. et al.	1989	Aureobasidium sp. SN-G42	k.A.	Kont. Kult. mit Abtrennung und Rück-führung der Biomasse, 1000 UpM	113/167	35	4,2	5,1	50	Ethanol	Batch-Phase: 40 % (w/v) Glucose, 8 % Maisquellwasser, Kont. Phase: wie in Batch-Phase
[166]	Sasaki, T et al.	1990	Aureobasidium sp. SN-124A, Mutante FERM BP-1430	98,6	Fermenter, Batch, 230 UpM	k.A.	35	4	k.A.	49,3	4,4 g/L Glycerin	20 % Glucose, 1,6 % Maisquellwasser
[167]	Höötmann, U. et al.	1991	Pichia farinosa ATTC20210	~4	Blasensäule, Batch, immobilisiert auf gesinterten Raschigringen	290	30	9,5	k.A.	k.A.	62,7 g/L Arabit, 76,5 g/L Glycerin	21 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % Harnstoff, 0,5 % MgSO ₄ ·7 h ₂ O, 1 % KH ₂ PO ₄ , 0,1 % CaCl ₂
[167]	Höötmann, U. et al.	1991	Pichia farinosa ATTC20210	~4	Blasensäule, Batch, freie Zellen	290	30	9,5	k.A.	k.A.	53,2 g/L Arabit, 63,8 g/L Glycerin	20 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % Harnstoff, 0,5 % MgSO ₄ ·7 h ₂ O, 1 % KH ₂ PO ₄ , 0,1 % CaCl ₂
[168]	Veiga Da Cunha, M. et al.	1992	Leuconostoc oenos	0,44	Fermenter, 250 UpM, anaerob	72	25	4,8	0,01	16	Acetat, Lactat, Ethanol, Glycerin, Alanin	FT-Medium ohne MnSO ₄ und Tween 80, 5 g/L Glucose
[169]	Omar, S.H. et al.	1992	Aspergillus niger Stamm 836	k.A.	Schüttelflaschen, Batch, 200 UpM, 3 % Calciumalginat	144	30	5,0 - 2,0	k.A.	k.A.	10 g/L Polyole, 18 g/L Citronensäure	160 g/L Saccharose, 150 mg/L KH ₂ PO ₄ , 600 mg/L NH ₄ NO ₃ , 450 mg/L MgSO ₄ ·7 h ₂ O, 0,1 mg/L FeSO ₄ , 0,25 mg/L ZnSO ₄
[170]	Aoki, M.A.Y. et al.	1993	Trichosporonoides Stämme	43	Schüttelkolben, 200 UpM, Batch	144	30	6,0 - 6,4	0,30	43	2,7 g/L Glycerin	10 % Glucose/Saccharose, 0,5 % Hefeextrakt, 0,1 % Harnstoff
[171]	Kim, S.Y. et al.	1997	Trigonopsis variabilis KCCM 35523	46	Rührkessel, Batch, 300 - 1200 UpM	240	30	6	0,19	28,6	k.A.	Initial 100 g/L Glucose, 5 g/L Hefeextrakt
[172]	Ueda, M. und Yamagishi, K.	1997	(Yallowia) Yarrowia lipolytica ATCC 8661	205,5	Kulturtank, Batch	96	27	4	2,14	51,3	k.A.	41 % (w/v) Glucose, 2,0 % Hefeextrakt, 0,1 % Thiaminhydrochlorid
[173]	Chang, C.C. und Liu, Y.T.	1997	HD22	3 % (w/v)	k.A.	96	34	?-2,1	k.A.	30	Arabit	20 % Glucose, 0,4 % Hefeextrakt, 0,1 % Soyaproteinhydrolysat, 0,5 % NH ₄ SO ₄ , 0,1 % CaCO ₃
[174]	Yang, J.P.-W.	1997	HD 22	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	30	k.A.	
[175]	Abe, S. und Satoshi, M.	1998	Moniliella pollinis MCI 3555	180,5	Fermenter, Batch, 800 UpM	96	35	3,5 - 3,7	1,88	45,1	6,7 g/L Glycerin	40 % Glucose, 2,522 % Maisquellwasser, 0,6305 % NH ₄ SO ₄ , 0,1 % KH ₂ PO ₄ , 0,005 % ZnSO ₄ , 0,005 % Vitamin B1, 0,05 % Antischaum
[176]	Park, J. et al.	1998	Trichosporon sp.	149	Fermenter, Fed-Batch, RK, 600 UpM	80	35	3,5	1,86	51	k.A.	22 % (w/v) Glucose, 4,5 % Maisquellwasser, 0,05 % Tween 20
[177]	Sheiru, K.	1999	CJ-NT1	182								
[178]	Hirata, A. et al.	1999	Ustilaginomycetes (Ustilago) 618A-01	100	Jar Fermenter, Fed-Batch	530	30	k.A.	0,19	39,3	keine Nebenprodukte	6 % Glucose, 1,0 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
[178]	Hirata, A. et al.	1999	Ustilaginomycetes (Ustilago) Stamm 618A-01	105	Jar Fermenter, Fed-Batch	630	30	k.A.	0,17	41,2	keine Nebenprodukte	10 % Glucose, 1,0 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
	Willke, T. (unveröff. Daten)	1999	SZ 101	140	Schüttelkolben, 120 UpM, Batch	232,32	30	5,0 - 3,0	0,60	51	15,0 g/L Glycerin, 2,5 g/L Ribit	330 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt,
	Willke, T. (unveröff. Daten)	1999	SZ 101	40	Schüttelkolben, 120 UpM, Batch	184,56	30	5,0 - 3,2	0,22	32	7,93 g/L Glycerin, 3,25 g/L Ribit	330 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt,
[179]	Cho, H. et al.	1999	Trichosporonoides megachiliensis MCI 3369	116	Schüttelkolben, 240 UpM	96	35	k.A.	1,21	k.A.	4,8 g/L Glycerin	30 % (w/v) Glucose, 1,0 % Hefeextrakt, 60 ppm Calcium als Ca(OH) ₂
[179]	Cho, H. et al.	1999	Moniliella pollinis MCI 3371	180,8	Rührkessel, 800 UpM	93	35	3,8 - 4,0	1,94	45,2	18,6 g/L Glycerin	40 % Glucose, 1,5 % Maisquellwasser, 0,886 % NH ₄ SO ₄ , 0,1 % KH ₂ PO ₄ , 0,005 % Thiaminhydrochlorid, 0,005 % Antischaum, 30 ppm Calcium als Ca(Cl) ₂
[179]	Cho, H. et al.	1999	Moniliella pollinis MCI 3371	147	Schüttelkolben, 240 UpM	96	35	k.A.	1,53	36,7	7,7 g/L Glycerin	40 % Glucose, 1,5 % Maisquellwasser, 0,886 % NH ₄ SO ₄ , 0,1 % KH ₂ PO ₄ , 0,005 % Thiaminhydrochlorid, 0,005 % Antischaum, 60 ppm Calcium als Ca(OH) ₂
[180]	Kim, S.Y. et al.	1999	Trigonopsis variabilis KCCM 10120, NTG/UV Mutante von KCCM 35523	170	Rührkessel, Fed-Batch, 300 - 1200 UpM	80	30	5,5	2,13	42,5	k.A.	Initial 100 g/L Glucose, 5 g/L Hefeextrakt. Gesamt 2,0 l.
[181]	Kim, S.Y. et al.	1999	Pichia sp. KCCM 10129, NTG/UV-Mutante eines Wildtypisolates aus Luft	212	Rührkessel, Fed-Batch, 300 - 1200 UpM	72	30	5,5	2,94	53	k.A.	Initial 100 g/L Glucose, 33,3 g/L Hefeextrakt, 8,33 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,33 g/L MgSO ₄ ·7 h ₂ O, Gesamt 1,8 l.
[182]	Kristofikova, L. et al.	1999	Aureobasidium pullulans, NTG/UV-Mutante A-321	130	Fermenter	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	74,55	keine Nebenprodukte	20 % Glucose
[183]	Nishita, K. und Uetake, N.	1999	Trichosporonoides megachiliensis SN-G42	168 (1) / 200 (2)	Fermenter, 680 UpM	96 (1) / 72 (2)	35	k.A.	1,75 (1) / 2,78 (2)	42 (1) / 50 (2)	k.A.	Zyklus 1: 40 % Glucose, 1,0 % Hefeextrakt, Antischaum, Zyklus 2: 40 % Glucose
[184]	Yang, S.W. et al.	1999	Candida magnoliae KFCC 11023, EMS-Mutante M2	85	Rührkessel, Batch	156	28	7	0,54	43	< 2 g/L Glycerin	20 % (w/v) Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % KH ₂ PO ₄ , 0,2 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,04 % MgSO ₄ ·7 h ₂ O
	Segueilha, L.	1999	N.N	N.N.	Repeated Fed-Batch	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	< 200 g/L Zucker in allen Kultivierungsstufen

[185]	Park, J.B. et al.	2000	Trichosporonoides madida DS 911	233	Fermenter 50 l, 300 UpM, 1 vvm	122	35	3,5	1,91	k.A.	k.A.	40 % (w/v) Glucose, 0,1 % Hefeextrakt, 4 % Maisquellwasser, 0,1 % Phytinsäure. Bei verbrauchter Glucose Austausch von 10 L Kultur gegen 10 l Glucosesirup und 350 g Maisquellwasser
[186]												
[187]	Kim, S.Y. et al.	2000	Trigonopsis variabilis KCCM-10120	170	Fermenter 5 l, Fed-Batch, 300-1200 UpM, 1,0-2,0 vvm	80	30	5,5	2,13	36,4	k.A.	Initial 200 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt (2 L), Zufüttern 1000 g Glucose, 110 g NaCl (1 L)
[188]	Ryu , Y.W. et al.	2000	Candida magnoliae	187	3,3 L Jar Fermenter, Fed-Batch, pO2 > 20 %	68	28	7	2,8	41	63 g/L Glycerin, 58 g/L Citronensäure	Initial für Wachstumsphase 20 g/L Glucose, Zufüttern bis zu 50 g/L, einfache Zugabe auf 400 g/L Glucose für Produktionsphase, 212 g/L Hefeextrakt
[189]	Lee, J.K. et al.	2000	Torula sp.	196	3 L Jar-Fermenter, Batch 500-850 UpM, 0,5 vvm	135	34	5,5	1,45	49,9	k.A.	400 g/L Glucose, 20 g/L Hefeextrakt, 10 mg/L MnSO4·4 h2O, 2 mg/L CuSO4·5 h2O
[159]	Kim, S.Y. et al.	2001	Pichia sp. KCCM 10129, NTG/UV-Mutante eines Wildtypisolates aus Luft	212	Fed-Batch	72	30	5,5	2,94	47,3	k.A.	Initial 180 g/L Glucose, 60 g/L Hefeextrakt, 15 g KH2PO4, 0,6 g MgSO4·7 h2O (1,8 L), Zufüttern von 1,2 L mit 1020 g Glucose und 60 g NaCl
[190]	Kim, S.Y. et al.	2001	Trigonopsis variabilis KCCM-10120	170	Fed-Batch	80	30	5,5	2,13	36,4	k.A.	Initial 200 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt (2 L), Zufüttern 1000 g Glucose, 110 g NaCl (1 L)
[191]	Kim, S.Y. et al.	2001	Torula sp. DS101 KCCM-10171	223	Batch	140	34	5,5	1,55	44,6	k.A.	50 % Saccharose, 2,5 % Hefeextrakt, 0,3 % KH2PO4
[192]	Seo, J.H. et al.	2001	Candida magn. SR 101 KCCM-10160	143	Batch	205	28	7,0-?	0,7	57	k.A.	25 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, 0,2 % (NH4)2SO4, 0,5 % KH2PO4, 5 % KCl, 0,04 % MgSO4
[157]	de Troostembergh, J.-C.M.-P. G. et al.	2001	Moniliella pollinis var. tomentosa (TCV364)	250-300	Fed-Batch	240	35	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Stärkehydrolysat, 4,5-5 % (w/v) Maisquellwasser, 400-500 ppm Siliconöl (SAG471), 400-500 ppm Xanthan
[193]	Lin, S.-J. et al.	2001	Strain 166-2, möglicherweise Moniliella	111	5 L Jar-Fermenter, Batch, 900 UpM, 1 vvm	144	30	5,3-3,2-4,4	0,77	37	k.A.	30 % Glucose, 1 % Hefeextrakt
[194]	Lee, J.K. et al.	2001	Torula sp.	182	5 L Jar Fermenter, Batch, 500-800 UpM, 0,5 vvm	135	34	5,5	1,35	45,5	k.A.	400 g/L Glucose, 20 g/L Hefeextrakt, 0,5 mM Phytinsäure
[195]	Oh, D.K. et al.	2001	Torula sp.	192	3 L Jar Fermenter, Fed-Batch, 500-850 UpM, 0,5 vvm	88	34	5,5	2,26	48	k.A.	400 g/L Glucose, 20 g/L Hefeextrakt, 3,3 mM Phytinsäure
[196]	Burschäpers, J. et al.	2002	Moniliella tomentosa var. pollinis	170	20 L RK, Fed-Batch, 400 UpM, 0,3 vvm	180	30	k.A.	0,92	k.A.	5 g/L Glycerin, 2 g/L Ribit, 2 g/L DP-3, 5 g/L DP-3	
[196]	Burschäpers, J. et al.	2002	Moniliella tomentosa var. pollinis	90	20 L RK, Batch, 400 UpM, 0,3 vvm	210	30	5,5-2,6	0,43	35	70 g/L Glycerin und Ribit	352 g/L Glucose, 20 g/L CSL, 1 g/L Harnstoff, 0,3 g/L SAG 471, 0,3 g/L Xanthan
[197]	Burschäpers, J. et al.	2002	Moniliella tomentosa var. pollinis	175	80 L Blasensäule	339	30	5,5-2,6	0,52	37	75 g/L Glycerin, Ethanol und Ribit	32 % (w/v) Glucose, 2 % (w/v) Maisquellwasser, 0,1 % (w/v) Harnstoff, 0,3 g/L SAG 471 Antischaum, 0,3 g/L Xanthan
[148]	Ookura, T. et al.	2002	Trichosporonoides megachiliensis	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
[198]	Lee, J.K. et al.	2002	Torula corallina	178	3 L Jar-Fermenter, Batch, 500 - 850 UpM, 0,5 vvm	138	34	5,5	1,29	44,5	2 mM Fumarat	400 g/L Glucose, 2 µg/L CuSO4·5 h2O,
[158]	Lin, S.J. et al.	2003	Moniliella sp., Stamm N61188-12	239	Schüttelkolben, 150 UpM,	144	30	6,0	1,66	68,4	keine Nebenprodukte gebildet	35 % Saccharose, 1 % Hefeextrakt
[199]	Lee, D.Y. et al.	2003	Candida magnoliae Wildtyp	14	1 L Jar Fermenter, Batch, 700 UpM, 1 vvm	150	28	7,0	0,09	35	k.A.	260 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton
[199]	Lee, D.Y. et al.	2003	Candida magnoliae Mutante	125	1 L Jar Fermenter, Batch, 700 UpM, 1 vvm	144	28	7,0	0,89	50	k.A.	260 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton
[200]	Lee, K.J. et al.	2003	Penicillium sp. KJ-UV29	45	5 L Jar Fermenter, Batch, 200 UpM, 1 vvm	192	37	7,0-4,0	0,23	k.A.	20,7 g/L Glycerin	30 % Saccharose, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % (NH4)2C2O4, 0,1 % KNO3, 0,01 % NaNO3, 0,01 % FeSO4, AZ-20R Antischaum

Tabelle 3-4 Übersicht über Verfahren zur Anreicherung und zur Erzeugung von Mutanten zur Erythritherstellung

	Autor	Jahr	Organismus	Herkunft	Medium	Dauer [h]	T [°C]	Methode	Beschreibung
[201]	Dooms et al.	1971	Moniliella tomentosa var. pollinis	Pollen	20 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 0,1 % Harnstoff, 2 % Agar	k.A.	30	Anreicherung	Probe wird in Medium angezogen
[170]	Aoki et al.	1993	Trichosporonoides	Honigwaben, frischer Pollen	(1) 40 % Glucose oder Saccharose, 1 % Hefeextrakt, 200 Upm, (2) 20 % Glucose oder Saccharose, 1 % Hefeextrakt, 2 % Agar	5 d	30	Anreicherung	Probe in 120 ml Kolben mit 20 ml Kulturmedium (1) bei 200 upm inkubiert. Ausstrichen auf Platte (2) und bei 30 °C anreichern. Überführen einzelner Kolo nie auf Agarröhrchen mit 20 % Glucose oder Saccharose, 1 % Hefeextrakt, 0,1 % Harnstoff, 2 % Agar
[178]	Hirata et. al.	1999	Stamm 618A-01	Pollen	(1) 20 % Glucose, 0,3 % getrockneter Bouillion, 1,5 % Agar; (2) 20 % Glucose, 1 % getrockneter Bouillion	k.A.	30	Anreicherung	Probe wird auf Platte auf (1) ausgelegt und nach Anwachsen auf (2) in Schüttelkolben überimpft
[163]	Ishizuka et al.	1989	Aureobasidium SN-124A	Boden einer Zuckerrohrplantage, NTG/UV-Mutante	(1) 33,5 % Glucose, 1,0 % Hefeextrakt; (2) 22 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar; (3) 22 % Glucose, 1 % Hefeextrakt	5-7 d	30	Mutante	Kulturröhrchen mit 5 ml (1) pH 5,5 werden inkubiert. Eine zwei Tage alte Kultur aus (3) wird auf 10 E7/ml verdünnt und in eine Petrischale gegossen. Bestrahlung mit einer 15 W UV-Lampe aus 30 cm für 20/40 min. Für die NTG Behandlung wird die gleiche Kultur für 30 min bei RT mit 1mg/ml NTG versetzt. Die Zellen werden auf Agarplatten (2) ausgebracht und bei 30 °C 2 d inkubiert. Die Zellen werden in Flüssigkulturen von (3) überführt. Die besten Zellen werden mit UV erneut behandelt. Screening auf 33,5 % Glucose. Der beste Stamm wird mit NTG behandelt. Der beste Stamm wird auf 40 % Glucose gescreent.
[180]	Kim et al.	1999	Trigonopsis variabilis	KCCM 35523	(1) 20 % Glucose, Agarplatte; (2) YM-Flüssigkultur; (3) 0,1 M Citratpuffer; (4) 40 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, Agarplatte; (5) 20 % Glucose	5-8 d	26-28	Mutante	Die Zellen werden in einem auf Platte (1) angezogen, in Flüssigkultur (2) überführt und dann in Puffer (3) gewaschen, zentrifugiert und mit 0,01 % NTG für 25-30 min behandelt. Danach werden die Zellen in Flüssigkultur (2) angezogen und auf Platte (4) ausgebracht. In Flüssigkultur (5) werden die besten Zellen ausgesucht, vereinzelt, und in (2) mit 250-270 nm UV-Licht bestrahlt. Der beste Stamm wird isoliert.
[181]	Kim et al.	1999	Pichia sp.	KCCM 10129	(1) 18-22 % Glucose, Agarplatte; (2) YM-Flüssigkultur; (3) 0,1 M Citratpuffer; (4) 40 % Glucose, 2% Hefeextrakt, Agarplatte; (5) 18.22 % Glucose	5-6 d	28-32	Mutante	Die Zellen werden in einem auf Platte (1) angezogen, in Flüssigkultur (2) überführt und dann in Puffer (3) gewaschen, zentrifugiert und mit 0,01 % NTG für 25-30 min behandelt. Danach werden die Zellen in Flüssigkultur (2) angezogen und auf Platte (4) ausgebracht. In Flüssigkultur (5) werden die besten Zellen ausgesucht, vereinzelt, und in (2) mit 250-270 nm UV-Licht bestrahlt. Der beste Stamm wird isoliert.
[182]	Kristofikova et al.	1999	Aureobasidium pullulans	k.A.	(1) 20 % Glucose; (2) Acetatpuffer, 2 M Glucose	k.A.	30	Mutante	Eine zwei Tage alte Kultur wird auf 103 Zellen/9 cm d Petrischale mit (1) verdünnt, aus 30 cm mit einer 30 W UV-Lampe bestrahlt. Danach wird mit 1 mg/ml NTG für 20 min behandelt, mit (2) gewaschen und für Schüttelkolbenversuche in (1) angezüchtet. Diese Schritte werden wiederholt, bis ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt wird.
[166]	Nikken Chemicals	1990	Aureobasidium sp.	Aureobasidium sp. SN-124A	(1) 22 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, (2) 22 % Glucose, (3) 22 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar, (4) 33,5 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar, (5) 33,5 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, (6) 40 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar, (7) 40 % Glucose, 1,6 % Hefeextrakt, (8) 45 % Glucose, 1,6 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar	k.A.	30-35	Mutante	Die Zellen werden auf (1) angezogen, auf 1:100 mit (2) verdünnt, und mit einer 15 W UV-Lampe aus 30 cm für 40 min bestrahlt. Die Zellen werden auf (3) angezogen und auf (1) kultiviert. Die Zellen werden wie oben beschrieben verdünnt und für 20 min wie oben beschrieben bestrahlt. Die Zellen werden auf (4) ausplattiert und in (5) kultiviert. Die Zellen werden abzentrifugiert, in 0,2 M Essigsäurepuffer mit 2 M Glucose aufgenommen, auf 10E7/ml verdünnt und mit 1mg/ml NTG für 30 min behandelt. Die Zellen werden abgetrennt, wie oben mit Puffer gewaschen und auf (6) ausplattiert. Die Kolonien werden gepickt, in (7) angezogen, mit (7) auf 10E7/ml verdünnt und mit 200 kRad gamma-Strahlen aus 18 cm Entfernung behandelt. Die Zellen werden auf (8) ausplattiert.

3.4.3 Zulassungssituation von Erythrit als Lebensmittelzusatz und für Pharmazeutika

Die Weltjahresproduktion von Erythrit lag 2001 bei ca. 50.000 Tonnen, die überwiegend in Japan (Fa. Nikken) und Italien (Fa. Cerestar) hergestellt wurden [202]. Das von Fa. Mitsubishi und Fa. Cargill geplante Werk in Illinois (USA) zur Herstellung von Erythrit ist umgewidmet worden [203], eine Erythritproduktion erfolgte nie in diesem Werk. Die nachfolgende Tabelle 3-5 zeigt die aktuelle Zulassungssituation für Erythrit als Lebensmittelzusatz.

Tabelle 3-5 Stand der aktuellen und beantragten Zulassungen von Erythrit in Lebensmitteln

Zulassungsland	Jahr der Zulassung	Pharmazeutische Zulassung
Japan	1990	
USA	1997	
Australien	1999	
Neuseeland	1999	
Taiwan	1999	
Singapur	2000	
Korea	2000	
Russland	2001	
China	2001	
Israel	2001	
Südafrika	2001	
Mexiko	2002	
Uruguay	2004	
Kanada	2004	
Philippinen	2004	
Niederlande	2004	
Belgien	2005	
Finnland	2005	
Argentinien	2005	
Europäische Union	Zulassung in der EU für März 2006 angekündigt	
Codex Alimentarius	Erythrit ist in den „Codex General Standard for Food Additives (GSFA)“ unter der Nummer INS – 968 aufgenommen	
Mercosur (Brasilien, Argentinien, Paraguay, Uruguay)	2005 (Veröffentlichung im Gesetzblatt steht bevor)	
Japan		Monographie zugelassen für JPE
Europäische Union		Monographie zugelassen für Ph. Eur.

Der Einsatz von Erythrit in pharmazeutischen Produkten bedingt die Eintragung in die nationalen und internationalen Indices und Regelwerke. Erythrit hat eine Eintragung in den europäischen Pharmazeutischen Index sowie in die japanischen Monographien für Pharmazeutika erhalten.

Erythrit verhält sich im Stoffwechsel anders als Glucose und Saccharose, daher sind Untersuchungen zum Einfluss auf den menschlichen Körper notwendig. Hierzu wurden verschiedene Untersuchungen an Mensch und Tier durchgeführt. Erythrit wird durch sein kleines Molekulargewicht schnell und zu ca. 90 % über den Dünndarm aufgenommen und über die Nieren ausgeschieden [204;70]. Dies bedeutet, dass nur ca. 10 % der eingenommenen Erythritmenge in den weiteren Verdauungstrakt gelangt. In der Darmflora kann das Erythrit zu flüchtigen Fettsäuren und Methan oder elementarem Wasserstoff umgesetzt werden [205;206]. Erythrit wird nicht durch den Stoffwechsel des Menschen zur Energieherstellung verwandt. Die orale Einnahme von Erythrit in Höhe von 1 g/kg Körpergewicht hat keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel und den Insulinpegel [207]. Der Erythritspiegel im Blut erreicht seinen Höhepunkt 30 – 40 Minuten nach der Einnahme und sinkt darauf hin ab [208], dies gilt ebenfalls für Diabetiker [209].

Die Gabe von 0,4 – 0,8 g/kg Körpergewicht hat keine Auswirkungen auf die Osmolarität des Blutplasmas und die Wasseraufnahme der Testpersonen. Weiterhin wurde kein Durchfall oder eine signifikante Änderung im Ionenspiegel des Blutplasmas oder des Urins festgestellt. Der Einfluss von Erythrit auf die Verdauung war mit dem der Saccharose vergleichbar [210]. Es wurde kein schädlicher Einfluss von Erythrit auf Flüssigkeitsaufnahme, Stuhlgang, Urinausscheidung, Blutdruck, Körpergewicht sowie Elektrolyt-, Creatinin-, Citrat- und Harnstoffausscheidung über die Nieren festgestellt. Ausscheidungen von Albumin, β_2 -Microglobulin und N-Acetylglucosaminidase und Calcium waren leicht erhöht, jedoch immer noch sehr gut im Rahmen der physiologischen Grenzen [211].

Eine allergische Reaktion wurde nur in einem einzelnen Bericht erwähnt, hierbei erwähnt der Autor, dass nur eine der beiden (zuvor durch Beschwerden aufgefallenen Testpersonen) nachweislich eine reproduzierbare allergische Reaktion aufwies. Die Wahrscheinlichkeit einer Unverträglichkeit wird auf $<10^{-6}$ eingeschätzt [212;213].

Eine Langzeituntersuchung an Ratten ergab, dass durch die Beimengung von bis zu 10 % Erythrit zur täglichen Nahrungsmenge keine Hinweise auf eine Tumor induzierende oder fördernde Aktivität oder einen Einfluss auf Fertilität oder Entwicklung der Nachkommenschaft gefunden werden konnten. Eine erhöhte Sterberate konnte nicht festgestellt werden [214;215]. Bei Ratten und Hunden wurden als Hauptausscheideweg von Erythrit die Nieren festgestellt [216;217]. Blutbild, Urinzusammensetzung sowie Verdauung zeigten bei dauerhaften Gaben von 20 % Erythrit an der Nahrung in einer Untersuchung an Ratten keine relevanten Nachteile für die Tiergesundheit [218;219].

Die dauerhafte Gabe von bis zu 10 % der täglichen Nahrung über ein Jahr hinweg bei Hunden zeigte keine krankhaften Veränderungen in sämtlichen Körperfunktionen der Hunde [220].

Die Mutagenität von Erythrit auf *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* sowie auf chinesische Hamster Fibroblastenzellen wurde untersucht. Es wurde keine erhöhte Mutationsrate im Zusammenhang mit der Gabe von Erythrit festgestellt [221].

Bei trächtigen Kaninchen hatte eine dauerhafte intravenöse Gabe von bis zu 5 g/kg Körpergewicht/d keine negativen Auswirkungen auf den Fötus und dessen Entwicklung. Es traten keine durch Erythrit verursachten Todesfälle der Föten auf [222].

Die Auswirkungen des Verzehres von erythrithaltigen Speisen und Getränken auf die Mikroflora des Mund-Rachen-Raumes, insbesondere auf den pH-Wert und die Plaquebildung wurden untersucht. Durch den vollständigen oder teilweisen Ersatz von Saccharose oder anderen Zuckeralkoholen durch Erythrit kann der pH-Wert und dadurch die Säurebildung, insbesondere Milchsäure, günstig beeinflusst werden, da Erythrit nur äußerst schwer durch die im Mundraum befindlichen Organismen verstoffwechselt werden kann [223;61;224]. Zugleich kann Erythrit nicht als Substrat für die Polysaccharidsynthese, insbesondere für Glucane, durch den Plaquebildner *Streptococcus mutans* verwandt werden [225]. Somit bleibt der pH-Wert der Mundhöhle auf ihrem natürlichen Niveau und die Zähne werden nicht durch Säure angegriffen.

3.5 Immobilisierung

Die Fixierung von lebenden oder toten Zellen sowie Enzymen in Gelpartikeln, Kapseln oder in umgrenzte Reaktionsräume wird als Immobilisierung bezeichnet

[226;227]. Die Immobilisierungsmethoden lassen sich in drei Gruppen einteilen: Bindung an Oberflächen (durch Adsorption, durch ionische Bindung und kovalente Bindung), Quervernetzung (mit Träger und ohne Träger), und Geleinschluss (quasi-Membranreaktor) [226]. In der industriellen Mikrobiologie werden Immobilisierungsverfahren zum Fixieren von Zellen und Enzymen verwandt, da deren Abtrennung aus der Reaktionslösung in manchen sehr aufwendig und schwierig sein kann [226].

3.5.1 Gelförmige Verkapselungsmatrizes

Eine Sonderform der Immobilisierung stellt die Einschlussimmobilisierung oder Verkapselung in Form des Geleinschlusses dar. Bei diesen Verfahren wird der Katalysator in eine dafür geeignete Matrix gebracht, in welcher er auch zumeist verbleibt, da die Poren der Matrix kleiner als der Katalystor sind oder der Katalysator selbst einen Teil der Matrix bildet. Diese Matrix lässt Substrate und Produkte zu den Katalysatoren zu- und abfließen. In der Biotechnologie bekannte Beispiele zur Herstellung von immobilisierten Biokatalysatoren in Gelen sind Sekt und Champagner [228], Palatinin [229] und Glucose/Fructose-Isomerisierung [2]. Zur Herstellung von Verkapselungsmatrizes werden im Allgemeinen polymere organische Substanzen verwendet, die gelieren können. Solche Gele bestehen aus zwei Komponenten, von denen die eine eine langkettige, feste oder verzweigte Verbindung darstellt und die andere eine Flüssigkeit. Ist Wasser die flüssige Komponente, handelt es sich um Hydrogele. Der feste Anteil des Geles bildet ein räumlich strukturiertes Netzwerk, in welchem die einzelnen Teilchen der festen Substanz aneinander haften. Das Wasser füllt die Zwischenräume dieser dreidimensionalen Struktur der festen Substanz aus und kann bis zu 90 % des Gelvolumens betragen [2]. Die dreidimensionale Struktur und der hohe Wasseranteil bei Hydrogelen erlauben eine im Gegensatz zu porösen keramischen Stoffen besseren Stofftransport im Netzwerk [230;231].

In der Biotechnologie werden bevorzugt Hydrogele zur Verkapselung von biologischen Katalysatoren eingesetzt. Zur Verwendung kommen hierbei natürliche Polymere wie Gelatine, Agar, Alginat [232], κ -Carrageenan und Pektin [233], modifizierte natürliche Polymere wie Carboxymethylcellulose, Sulfoethylcellulose, Chitosan [234] und synthetische Polymere wie Polyvinylalkohol [235;236], Acrylamid und Polyurethan [237]. Eine Übersicht über die verschiedenen Polymerisierungsmechanismen, Gelbildungsmechanismen, deren Vorzüge und Nachteile sowie physiko-chemischen Eigenschaften sind in der Literatur beschrieben [238;239;240]. An dieser Stelle werden nur die verwendeten Polymersysteme Calcium-Alginat und Polyvinylalkohol näher erläutert.

An die Verkapselungsmatrizes zum Einschluss von Biokatalysatoren werden verschiedene Anforderungen gestellt. Sie sollen kostengünstig sein, einfach zu verarbeiten, die Immobilisate sollen eine hohe mechanische Stabilität aufweisen und die Immobilisierungsmatrix sowie der Immobilisierungsvorgang sollen nicht schädlich für den einzuschließenden Biokatalysator sein.

Bei allen Einschlussimmobilisierungen können Stofftransportprobleme auftreten. Der Diffusionswiderstand hängt von Porenstruktur (Labyrinthfaktor) des Gels und dem zurückzulegenden Weg ab. Mit zunehmendem Vernetzungsgrad eines Gels steigt die mechanische Festigkeit, jedoch sinken auch die Durchmesser der Poren und sie werden zunehmend verwinkelter. Ein technisch geeignetes Einschlussimmobilisat muss einen Kompromiss zwischen Festigkeit und Diffusionslimitierung bieten, um sinnvoll einsetzbar zu sein.

Die Biomasseanfangsbeladung von Immobilisaten spielt für die Leistungsfähigkeit der immobilisierten Biomasse eine wichtige Rolle. Werden sich teilende Mikroorganismenzellen verkapselt, so können sich diese nicht frei im Gel bewegen und bilden stationär Kolonien aus. Eine zu hohe Koloniedichte führt zu einem Schalenkatalysator, bei dem keine Nährstoffe mehr in das Innere des Immobilisats vordringen können. Dieser Bereich ist dann für die Biokatalyse nicht mehr einsetzbar, da er unterversorgt ist. Der Schalenbereich des Katalysators weist im Vergleich zu einem ideal beladenen Immobilisat eine niedrigere Menge an katalytisch aktiver Biomasse auf. Bei einer zu niedrigen Koloniedichte bilden sich einzelne, sehr große Kolonien aus. Die dabei entstehende katalytisch aktive Biomasse ist im Vergleich zu einem ideal beladenen Immobilisat niedriger. Für eine optimale Aktivität ist eine mittlere Biomassebeladung zu wählen.

Durch diese räumliche Trennung von eingeschlossenem Katalysator und Umwelt kann in vielen Fällen eine unsterile Prozessführung realisiert werden [241]. Bei geeignetem Herstellungsverfahren ist der erfolgreiche Einschluss von Biokatalysatoren in synthetischen Gelen trotz der – im Vergleich zu Verfahren mit natürlichen Polymeren – aggressiveren Bedingungen gut möglich [242;243;227;244;245].

3.5.2 Hydrogele aus Calcium-Alginat

Alginat ist ein Polysaccharid aus den Monomerbausteinen D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure (β -D-Mannuronsäure – α -L-Guluronsäure (1 \rightarrow 4)), kommt in Algen vor und wird aus diesen gewonnen. Das Molekulargewicht liegt zwischen 32.000 – 200.000 Dalton, was einem Polymerisationsgrad von 180 – 930 Einheiten entspricht [2;154].

Die Herstellung von Gelen auf der Basis von Alginat erfolgt in den meisten Fällen durch die ionotrope Gelbildung mit Calciumionen [246;232]. Wird eine Natrium-Alginat-Lösung in eine Lösung mit Calciumionen eingetropft, so bildet sich zuerst eine dünne, ionendurchlässige Membran aus Calcium-Alginat. Durch diese Membran diffundieren weiterhin Calciumionen aus der Flüssigphase in das Innere der Kugel hinein und vernetzen die benachbarten Polymerketten des Alginats. Nach der vollständigen Durchdringung des Alginattropfens mit Calciumionen wird eine feste Vollkugel aus Calciumalginat gebildet.

Die Vorteile der Herstellung von Immobilisaten auf Basis von Na-Alginaten ist der günstige Preis, das breite Wissen um Alginat und die schon eingeführte Technik zur Herstellung von Alginatimmobilisaten. Die Nachteile sind geringe Abriebfestigkeit, die biologische Abbaubarkeit, durch die oftmals eine sterile Betriebsführung erforderlich wird, und die Empfindlichkeit gegenüber dem Fällens von Calciumionen in Gegenwart von Phosphat und damit Auflösen des Gels [247;248;249].

3.5.3 Hydrogele aus Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol wird aus in Methanol polymerisiertem Vinylacetat mit anschließender Alkoholyse des entstandenen Polyvinylacetats in basischem Milieu zu Polyvinylalkohol hergestellt [250;251]. Entsprechend den Herstellungsbedingungen lassen sich verschiedene Substitutionsgrade herstellen. Polyvinylalkohole (PVAL) kommen heute in vielen Bereichen des Lebens vor, so in der Textil-, Papier-, Farben-, Verpackungs- und Klebstoffindustrie.

Sind die PVAL-Ketten ohne störende Acetatgruppen, können sich diese Ketten in einem parallelen Muster anordnen und durch Wasserstoffbrückenbindungen in

kaltem Wasser schlecht lösliche kristalline Bereiche ausformen, die ein festes Aggregat ausbilden. Für die erfolgreiche Verwendung in der Immobilisierung ist ein Verseifungsgrad von mindestens 98 % erforderlich [252;253;254].

Durch Zuführen von Energie werden diese kristallinen Bereiche aufgebrochen und die Hydroxygruppen können mit einer Hydrathülle umgeben werden. Das Polymer kann somit in Lösung überführt werden. Durch Abfall der Temperatur bilden sich wieder kristalline Bereiche zwischen den Polymerketten des Polyvinylalkohols aus. Da diese kristallinen Bereiche jedoch nicht so regelmäßig sind wie in einer reinen Polyvinylalkoholphase, bildet sich in Gegenwart des Wassers ein Gel aus.

Die Gelierung von wässrigen Polyvinylalkohollösungen kann auf verschiedene Arten erreicht werden. Möglich sind dabei die Komplexbildung mit Borsäure, Kongorot oder mehrwertigen Metallionen (z.B. Ti^{4+}), kovalente Vernetzung durch Formaldehyd [255], Temperaturabsenkung (freeze-thaw) [236;252;253;256] und die Entfernung von Wasser aus dem Reaktionsgemisch durch Trocknung (LentiKats®) [257;258]. In dieser Arbeit werden nur Polyvinylalkoholimmobilisate durch Trocknung verwandt. LentiKats® besitzen den Vorteil eines relativ großen Durchmessers, wodurch die Immobilisatpartikel gut mechanisch durch Siebe und Lochplatten zurück zu halten sind. Durch ihre linsenförmige Struktur und die geringe Dichte und Dicke der Polymerstränge haben sie den Vorteil günstiger Diffusionseigenschaften. Hierdurch wird die Versorgung der im Inneren des Immobilisats befindlichen Biokatalysatoren positiv beeinflusst. Die milden Herstellungsbedingungen von LentiKats® machen sie ideal zur Einschlussimmobilisierung von empfindlichen Biokatalysatoren. Weitere Vorteile sind die hohe mechanische Stabilität und die gut biologische Stabilität in geliertem Zustand.

3.6 Schaumbildung während der Fermentation

Schäume sind in der heutigen Zeit allgegenwärtig. In vielen Bereichen sind sie unabdinglich und werden absichtlich hervorgerufen, so im Haushalt in Schlagsahne, Schaumbädern, Brot, Speiseeis, Baiser, Bier, Haarschäumen und Haarschampoo. In der Technik treten sie in Schaumstoffen, Elastomeren, Metallschäumen oder Betonen auf. Schäume finden weiterhin Anwendung in der Flotation, in Feuerlöschmitteln und als Förderhilfsmittel bei der Erdölförderung [2;259].

Im Bereich der Fermentation sind Schäume jedoch hinderlich und nicht erwünscht, da sie die Prozessführung erheblich erschweren oder sogar unmöglich machen und so zu einem Wechsel des Verfahrens zwingen [260;261;262]. Schäume sind die Folge des Auftretens von natürlichen Tensiden wie proteinhaltigen Medien [263;264], lysierender Biomasse, oder Saponine bei der Saftreinigung in der Zuckerherstellung [265].

In der Literatur wurden die theoretischen Grundlagen der Schaumzerstörung ausführlich diskutiert [266;267;268], aber es fehlen experimentelle Studien, um diese Modelle zu beweisen [269]. Durch Schaumbildung werden in Bioprozessen die in Tabelle 3-6 aufgeführten Probleme hervorgerufen [270].

Tabelle 3-6 Durch Schäume in Bioprozessen auftretende Probleme

Physikalische Effekte	Biologische Effekte
<ul style="list-style-type: none"> • Verstärkte Inhomogenität des Mediums • Blockierung von Ein- und Auslässen • Störung der Prozessführung • Verminderter Stoffübergang • Verlust von Produkt und Biomasse 	<ul style="list-style-type: none"> • Anreicherung von Biomasse im Schaum • Erhöhte Zelllyse im Schaum • Veränderungen im Metabolismus durch Nährstofflimitierung • Inhomogene Sauerstoffversorgung • Sterilitäts-/ Kontaminationsprobleme

Durch Flotation wird in Schäumen Biomasse aus der flüssigen Reaktionsphase ausgetragen und steht nicht mehr für die Kultivierung zur Verfügung. Die Folge sind verminderte Aktivität und Ausbeute. Die in den Schäumen gebundenen Nährstoffe fehlen in der Kultivierung und senken somit die Ausbeute. Die mit dem Schaum ausgetragene Biomasse kann – bedingt durch die Unterversorgung im Schaum – schnell absterben und weitere oberflächenaktive und filmbildende Substanzen freisetzen, die die Schaumbildung wiederum fördern [270]. Zudem können Schäume Messsonden, die in den Reaktorraum ragen, in ihrer Funktionsweise beeinträchtigen und somit falsche Informationen für die Mess-, Steuer- und Regelungstechnik verursachen. Ein- und Auslässe sowie Filter können zugesetzt werden und zu veränderten Druckverhältnissen führen. Es treten verstärkte Inhomogenitäten auf, die zu Zonen verminderter Durchmischung und verringerter Nährstoff- sowie Sauerstoffversorgung führen. Durch diese Einflüsse können Veränderungen im Stoffwechsel auftreten. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination wird durch Schaumbildung erhöht [271].

3.6.1 Grundlagen der Schaumbildung

Definitionsgemäß sind Schäume gasgefüllte, kugel- oder polyederförmige Gebilde, die durch flüssige, halbflüssige, hochviskose oder feste Zellstege begrenzt werden [2]. Es wird zwischen festen und flüssigen Schäumen unterschieden [259]. In dieser Arbeit werden nur Schäume betrachtet, die von flüssigen Zellstegen begrenzt werden. Flüssige Schäume werden unterteilt in feuchte Schäume, bei denen der Flüssigkeitsgehalt nahe null ist und feuchten Schäumen, bei denen der Flüssigkeitsgehalt gegen 20 % geht [259]. Der Übergang ist fließend. Schaum kann nur entstehen, wenn die Zerfallsrate niedriger als die Schaumbildungsrate ist. Die Stabilität eines Schaums ist abhängig von der Stabilität der Einzellamellen und der Zellstege ab. Diese können in ihrer Stabilität durch verschiedene äußere Einflüsse wie Temperatur, Dampfdruck, Druck, pH, Oberflächenspannung sowie die Gegenwart von Tensiden oder anderen Schaumstabilisatoren und –destabilisatoren beeinträchtigt werden. Lamellen besitzen eine Stärke zwischen 4 – 600 nm. Der Zerfall eines Schaums ohne äußere Einwirkungen erfolgt durch das Auslaufen der Schaumlamellen. Je feuchter ein Schaum ist, desto langsamer läuft die Lamelle aus und desto höher ist die Standzeit. Schäume werden erzeugt, indem ein Gas in eine geeignete Flüssigkeit eingetragen wird, beispielsweise durch Einblasen, Rühren oder Schlagen. Die enthaltenen grenzflächenaktiven Stoffe, die ein Filmbildungsvermögen besitzen müssen, bilden den Schaum. Schaum kann in unterschiedlichen Formen entstehen. Bis zu einer Volumenkonzentration des Gases von 74 % ist der Schaum auf Grund der Oberflächen verkleinernden Wirkung der Oberflächenspannung kugelförmig [2]. Oberhalb dieser dichtesten Kugelpackung geht der Schaum in polyedrische Lamellen über. Im Übergangsbereich können Mischformen entstehen. Die in Fermentationen auftretenden Schäume entspringen einem Dreiphasengemisch, in dem die Biomasse den festen und das Medium den flüssigen Bestandteil stellt. Im Bioreaktor liegen grenzflächenaktive, filmbildungsbereite Stoffe in Form von Medienbestandteilen wie Proteinen und Fetten vor. Durch das Absterben und die Lyse von Zellen werden ebenfalls grenzflächenaktive Substanzen freigesetzt, hierbei kann es sich um Fettsäuren, Phospholipide, Glycolipide, Glycopeptide und DNS handeln. Zelllyse kann durch Abweichen von den optimalen Kultivierungsbedingungen oder Medienzusammenstellungen erfolgen. In der

stationären Phase und in der Absterbephase einer Kultur lysieren die Zellen ebenfalls. Schaumbildung zeigt somit ein Abweichen von den festgesetzten Kultivierungsparametern oder der Medienqualität an. Der Leistungseintrag des Rührens kann feinperlige Schäume an der Grenze zur Emulsion erzeugen; diese haben eine gegenüber Kugelschäumen oder Lamellenschäumen stark erhöhte Stabilität. Durch das Abschneiden der schaumgebundenen Biomasse von der Nährstoffversorgung kann diese absterben, und dadurch wie beschrieben weitere grenzflächenaktive, filmbildungsbereite Substanzen freisetzen. Diese führen wieder zu einer vermehrten Schaumbildung, in der wieder Biomasse aus der Fermenterbrühe ausgetragen wird.

3.6.2 Schaumbekämpfung

Wie eingangs beschrieben, bringt die Schaumbildung eine Vielzahl an nicht vorhersagbaren Störungen mit sich, die für den reproduzierbaren Betrieb einer Fermentation nicht wünschenswert sind. Um der Schaumbildung entgegen zu wirken, sind Methoden chemischer, physikalischer und mechanischer Art verfügbar. Die Auswahl der jeweiligen Methodik ist abhängig von den Gegebenheiten. Oftmals führt die alleinige Anwendung von einer der Methoden nicht zum Erfolg, sie muss mit anderen Methoden kombiniert werden [272]. Die drei Stufen der Schaumvermeidung sind die Vermeidung der Schaumbildung durch geeignete Wahl des Verfahrens, der Chemikalien und der Mikroorganismen, die Verhinderung der Schaumbildung durch Schaumverhütungsmittel und die Schaumzerstörung durch chemische, physikalische und mechanische Methoden.

3.6.2.1 Chemische Methoden

Zur Zerstörung von Schäumen stehen sowohl Schaumverhütungsmittel als auch Entschäumer zur Verfügung. Um ein erfolgreiches Ergebnis zu erzielen, muss für jedes Fermentationsproblem das passende Antischaummittel ausgewählt werden. Hierbei spielen Faktoren wie die Beeinflussung des Sauerstoffübergangs und der Sauerstofflöslichkeit genau so eine Rolle wie die spätere Abtrennbarkeit im Rahmen der Produktgewinnung und die Toxizität gegenüber den verwendeten Organismen [262].

Schaumverhütungsmittel sind Substanzen, die schäumenden Flüssigkeiten zugesetzt werden können, um die Schaumbildung zu verhindern oder zu reduzieren. Schaumverhütungsmittel sind entweder Substanzen, die die Schaumbildner aus der Grenzfläche verdrängen ohne dabei selbst Schaumbildung aufzuweisen, oder Substanzen, die die Oberflächenspannung des Wassers erhöhen.

Bei Entschäumern handelt es sich um Substanzen, die an der Grenzfläche festflüssig einen geschlossenen Film bilden und dem zu entgasenden Medium dadurch die Möglichkeit geben, innerhalb kürzester Zeit unter Zerstörung der Gasblasen den energieärmsten Zustand einzunehmen.

Entschäumer und Schaumverhütungsmittel gehören den natürlichen Fetten, epoxidierten Fetten, Fettalkoholen, Estern und Ölen an.

Die Veränderung des pH-Wertes kann Einfluss auf den Ladungszustand von oberflächenaktiven Substanzen nehmen. Beim Erreichen des isoelektrischen Punktes gehen bei vielen ladungstragenden Substanzen die filmbildenden Eigenschaften auf ein Minimum zurück.

3.6.2.2 Physikalische Methoden

Physikalische Methoden zur Schaumzerstörung bedienen sich thermischer und elektrischer Verfahren. Thermische Methoden nutzen die Effekte der Trocknung und Verdunstung der Flüssigkeit in Lamellen aus. Die Viskosität der Lamellen wird erhöht und sie verlieren dadurch ihre Geschmeidigkeit [262;270]. Zudem wird durch den Flüssigkeitsverlust die Dicke und damit Stabilität der Lamellen bis zum Zusammenbruch der Lamelle herabgesetzt. Eine Erhitzung von Schäumen mittels Mikrowellen, Warmluft, Kontaktwärmeüberträger oder Dampf führt zur Expansion der Gase, so dass die Schaumlamellen dem erhöhten Innendruck nicht mehr Stand halten können und platzen.

Elektrische Verfahren zerstören die Blasen durch elektrische Entladungen zwischen zwei im Reaktionsraum befindlichen Elektroden [273;270].

In der industriellen Biotechnologie kommen solche Verfahren nur vereinzelt zum Einsatz, da diese Verfahren in den meisten Fällen auch schädlich für die kultivierten Mikroorganismen sind. Dennoch sind in der Literatur eine Vielzahl an Untersuchungen zu solchen Verfahren beschrieben worden.

3.6.2.3 Mechanische Methoden

Die meisten mechanischen Verfahren zur Schaumzerstörung bedienen sich der Zentrifugal- und Scherkräfte. Prinzipiell sollen damit eine erhöhte Beschleunigung der Drainage und damit ein Auslaufen der Lamellen, lokale Minimierungen der Lamellendicke sowie die lokale Minimierung der Grenzflächenbelegung mit oberflächenaktiven Substanzen erreicht werden [265;262].

Zwar wird durch mechanische Verfahren bei der Zerstörung des Schaums auch Energie in den Reaktionsraum eingetragen, doch ist diese so niedrig, dass sie keine nennenswerte Erwärmung verursacht. Durch die Einwirkung von Scherkräften kann Biomasse aufgeschlossen und dadurch oberflächenaktive Substanzen in das Medium eingetragen werden. Bei der Erzeugung von scherempfindlichen Produkten ist der Einsatz von mechanischen Verfahren daher sorgfältig abzuwägen. In Fermentern werden zumeist Rotationseinsätze, Hydrozyklone und Zentrifugenkörbe eingesetzt [271;274]. Die Beregnung mit arteigener Flüssigkeit stellt eine besondere Form der mechanischen Schaumzerstörung dar. Dabei wird die kinetische Energie des fallenden Tropfens zur Zerschlagung des Schaums genutzt [275;276;277;262;278].

Ultraschallverfahren erzeugen Resonanzvibrationen und Schalldruckwellen, die zu Kavitation und Turbulenzen auf den Lamellen führen [271;269;272].

Weiterhin können hydrophobe Membranen in den Reaktorraum eingebracht werden, die eine mechanische Barriere für den Schaum darstellen und ihn gleichsam zerstören [264;272]. Möglich sind auch die Aufbringung von mechanischen Schwingungen durch Vibratoren oder Rüttler auf den Reaktionsraum. Diese Schwingungen haben durch ihre im Vergleich zu Ultraschall niedrige Frequenz keine negative Auswirkung auf die Mikroorganismenzellen. Der Nachteil dieser Methode ist die Dauerschwingungbelastung auf das Material, insbesondere auf jegliche Verbindungsstellen, die auf Dauer ermüden und versagen werden.

4 Material und Methoden

4.1 *Verwendeter Stamm*

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde der Pilz SZ 101 der Südzucker AG verwendet. Dabei handelt es sich um einen osmophilen, hefeartig wachsenden Organismus.

4.2 *Stammhaltung*

In drei 300 mL Erlenmeyerkolben mit je drei Schikanen wurden je 48 mL Standardmedium mit 2 mL einer vorhandenen Kultur des Pilzes SZ 101 (ebenfalls in Standardmedium, nach 48 h Inkubation) angeimpft (4 % (v/v)). Nach 96 h Inkubation bei 33 °C und 120 UpM wurden die Kulturen auf zwei 500 mL Zentrifugenbecher aufgeteilt und 10 Minuten bei 6.500 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets zweimal mit jeweils 150 mL frischem Standardmedium gewaschen. Schließlich wurden die beiden Pellets ad 100 mL frischem Standardmedium vereinigt und resuspendiert. Nach Mischen mit 200 mL sterilisiertem Pharmaglycerin wurde die Glycerinstockkultur zu jeweils 2 mL in sterile 2,5 mL Reaktionsgefäße mit Schraubkappe überführt und bei –80 °C eingefroren.

4.3 *Anzucht der Biomasse*

4.3.1 *Anzucht der Vorkulturen*

Die verwendeten Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyer-Kolben mit drei Schikanen und Überwurfkappen aus Aluminium angezogen. Dazu wurden 48 mL Standardmedium mit 2 mL Glycerinstockkultur angeimpft. Die Stockkultur wurde zu diesem Zweck 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Kolben wurden bei 33 °C und 120 UpM in einem temperierten Schüttelschrank inkubiert. Nach 48 h wurden jeweils 2 mL Vorkultur auf 48 mL neues Standardmedium überimpft (4 % (v/v)). Nach weiteren 48 h wurde die Vorkultur zur Animpfung von Versuchskulturen eingesetzt.

4.3.2 *Anzucht der Versuchskulturen*

Die für die Kultivierung vorbereiteten sterilisierten Schüttelkolben mit einem Volumen von 300 mL und drei Schikanen werden aseptisch mit 48 mL Medium und 2 mL Vorkultur nach 4.3.1 befüllt. Bei aerober Versuchsführung wurde eine Überwurfkappe, bei anaerober Versuchsführung ein gasdicht schließender Stopfen verwandt. Die beimpften Kolben werden in einem temperierbaren Schüttelschrank bei einer Temperatur von 33 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 UpM (Schüttelamplitude 50 mm) kultiviert.

4.4 Medienzusammensetzung

4.4.1 Standardmedium ohne Phosphat für Fermentationen und Schüttelkolbenversuche

Das Standardmedium war wie in Tabelle 4-1 angegeben zusammengesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-1 Standardmedium ohne Phosphat

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L

4.4.2 Standardmedium mit Phosphat für Fermentationen und Schüttelkolbenversuche

Das Standardmedium war wie in Tabelle 4-2 angegeben zusammengesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 5,5.

Tabelle 4-2 Standardmedium mit Phosphat

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L

4.4.3 Medium mit verschiedenen Kohlenhydratquellen

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-3 angesetzt. Die Kohlenstoffquelle wurde getrennt vom Hefeextrakt in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt.

Tabelle 4-3 Medium mit verschiedenen Kohlenhydratquellen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Palatinosemutterlauge	400	g/L
Palatinosemutterlaugehydrolysat 25 °C	200	g/L
Palatinosemutterlaugehydrolysat 70 °C	200	g/L
Dicksaft	400	g/L
Rohzuckerkläre	400	g/L
Palatinose	400	g/L
Trehalulose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L

4.4.4 Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoffquellen auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-4 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt von der Stickstoffquelle und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde

mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 4 M Natronlauge auf 6,5 eingestellt.

Tabelle 4-4 Medium mit unterschiedlichen Stickstoffquellen

Substanz	Hersteller	Konzentration	
Saccharose		400	g/L
Stickstoffquellen			g/L
Hefeextrakt, granuliert	Merck, Darmstadt	10	g/L
Hefeextrakt, flüssig	Hartge, Hamburg	10	g/L
Hefeextrakt, flüssig	Ohly, Hamburg	10	g/L
Rübenzuckermelasse, flüssig	Süßzucker, Neuoffstein	10	g/L
Maisquellpulver	Marcor, USA	10	g/L
Maisquellwasser	Sigma, USA	10	g/L
KH ₂ PO ₄		5	g/L

4.4.5 Medium mit verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Hefeextraktkonzentration auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-5 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-5 Medium mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10; 15; 20; 25; 30; 40; 50	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L

4.4.6 Medium mit verschiedenen Hefeextrakt- und Ammoniumchloridkonzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Hefeextrakt- und Ammoniumchloridkonzentration auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-6 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt, dem Ammoniumchlorid und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5. Der Gesamtstickstoffanteil im Hefeextrakt beträgt 101,6 mg/g. Zur vereinfachten Berechnung der Stickstoffanteile wird dieser Betrag auf 10 % gerundet.

Tabelle 4-6 Medium mit verschiedenen Hefeextrakt und Ammoniumchloridkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	3; 5,3; 7,5; 9,8; 12; 15	g/L
NH ₄ Cl	0; 11,5; 20,2; 28,7; 37,4; 45,8	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L

4.4.7 Medium mit verschiedenen Kartoffelrestfruchtwasser-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Kartoffelrestfruchtwasserkonzentration auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-7 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Kartoffelrestfruchtwasser und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider

Lösungen wurde mit sterilem 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 5,5 – 6,0.

Tabelle 4-7 Medium mit verschiedenen Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Kartoffelrestfruchtwasser	15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 90	g/L
KH_2PO_4	5	g/L

4.4.8 Medium mit verschiedenen Rindergülle-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses der separierten Rindergüllekonzentration auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß Tabelle 4-8 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt von der Gülle und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Bei Güllekonzentrationen über 500 g/L wurden die Saccharose und das Kaliumdihydrogenphosphat in der sterilisierten Gülle gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt und betrug in allen Ansätzen 6,0.

Tabelle 4-8 Medium mit verschiedenen Konzentrationen separierter Rindergülle

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Separierte Rindergülle	140; 150; 160; 180; 200; 220; 250; 300; 400; 500; 550; 739	g/L
KH_2PO_4	5	g/L

4.4.9 Medium mit verschiedenen Ribit-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Ribit auf die Erythritbildung wurden Medien gemäß der nachfolgenden Tabelle angesetzt. Die Saccharose wurde zusammen mit dem Ribit getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-9 Medium mit verschiedenen Ribitkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH_2PO_4	5	g/L
Ribit	0; 1; 2; 5; 10; 20; 50	g/L

4.4.10 Medium mit verschiedenen Erythrit-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Erythrit auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen Erythrit-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-10 angesetzt. Die Saccharose und das Erythrit wurden getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser gelöst und sterilisiert. Nach der sterilen Vereinigung beider Lösungen wurde mit sterilem 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Wasser bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-10 Medium mit jeweils verschiedenen Erythrit und Saccharosekonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	50; 100; 200; 400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH_2PO_4	5	g/L
Erythrit	100; 150; 200; 250	g/L

4.4.11 Medium mit verschiedenen Ethanol-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen Ethanol-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-11 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und sterilfiltriertes Ethanol in entsprechenden Volumina zugegeben. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-11 Medium mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L
Ethanol	0; 5; 10; 20; 40; 60	g/L

4.4.12 Medium mit verschiedenen Glycerin-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Glycerin auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen Glycerin-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-12 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und sterilfiltriertes Glycerin in entsprechenden Volumina zugegeben. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-12 Medium mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
Glycerin	0; 20; 40; 60; 80; 100	g/L

4.4.13 Medium mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Phosphat auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen KH₂PO₄-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-13 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-13 Medium mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH ₂ PO ₄	0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20	g/L

4.4.14 Medium mit verschiedenen Cystein-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Cystein auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen Cystein-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-14 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 4,3 – 5,5.

Tabelle 4-14 Medium mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	15	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L
Cystein	0; 0,1; 0,5; 1; 2	g/L

4.4.15 Medium mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von Sulfat auf die Erythritbildung wurden Medien mit verschiedenen Na₂SO₄-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-15 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 5,5.

Tabelle 4-15 Medium mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	15	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L
Na ₂ SO ₄	0; 1; 2; 5; 10; 20	g/L

4.4.16 Medium mit verschiedenen Spurenelementen

Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Spurenelementen auf die Erythritbildung wurden einzelne Medien mit jeweils verschiedenen MgCl₂ -, CuCl₂ -, MnCl₂ -, FeCl₃ - und CaCl₂ -Konzentrationen gemäß Tabelle 4-16 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt und dem Kaliumdihydrogenphosphat in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt und die entsprechende Menge an in sterilem 5 µS/cm Wasser gelöstem Spurenelement zugegeben. Die Zugabe erfolgte durch einen Sterilfilter. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-16 Medium mit verschiedenen Spurenelementlösungen

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L
Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ₃₊ , Ca ²⁺	0; 1; 5; 10; 25; 50; 100	mg/L

4.4.17 Medium mit verschiedener Vitamin B1-Konzentration

Zur Untersuchung des Einflusses von Vitamin B1 auf die Erythritbildung wurde Medien mit verschiedenen Vitamin B1-Konzentrationen gemäß Tabelle 4-17 angesetzt. Die Saccharose wurde getrennt vom Hefeextrakt in 5 µS/cm Wasser gelöst und sterilisiert. Die beiden Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt und die entsprechende Menge an in sterilem 5 µS/cm Wasser gelöstem Vitamin zugegeben. Die Zugabe erfolgte durch einen Sterilfilter. Mit sterilem 5 µS/cm Wasser wurde bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und betrug 6,5.

Tabelle 4-17 Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin B₁

Substanz	Konzentration	
Saccharose	400	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
KH ₂ PO ₄	5	g/L
Vitamin B ₁	0; 1; 5; 10; 25; 50; 100	mg/L

4.5 Immobilisierung

4.5.1 Immobilisierung in PVAL

4.5.1.1 Polymerlösung

Für die Herstellung von Geleinschlusskörpern auf Basis von Polyvinylalkohol wurde LentiKat[®]Liquid (geniaLab, Braunschweig) eingesetzt.

4.5.1.2 Stabilisierlösung

Zum Abbruch der Gelierreaktion wurde LentiKat[®]Stabilizer (geniaLab, Braunschweig) eingesetzt.

4.5.1.3 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Vorkulturgefäß in ein sterilisiertes Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 4.000 g abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweifach mit 400 g/L Saccharose in 5 µS/cm Wasser gewaschen und danach in etwas dieser Lösung resuspendiert.

4.5.1.4 Herstellung von LentiKats[®]

Die LentiKat[®]Liquid wird in der Mikrowelle in mehreren Zyklen von 30 s vollständig aufgeschmolzen. Diese Schmelze wurde unter Rühren bis auf ca. 40 °C abgekühlt. Dann wurden die vorbereiteten Zellen hinzugegeben und mit sterilem 5 µS/cm Wasser bis auf das geforderte Volumen aufgefüllt. Die Lösung wird zügig gut durchmischt und in den Unterteil einer Petrischale (Ø 145 mm) überführt. Diese wird in den nivellierten LentiKat[®]Printer eingelegt. Das Gerät wird justiert und die Stifte werden mit der Polymer-Biomasse-Mischung beladen. Das Unterteil der Petrischale wird entnommen und ein ausgewogenes Oberteil einer Petrischale (Ø 145 mm) wird mit Adapter eingelegt. Die an den Stiften anhaftende Polymer-Biomasse-Mischung wird auf das Unterteil der Petrischale übertragen. Die Petrischalen mit den Polymertröpfchen werden vorsichtig und ohne Erschütterung erneut ausgewogen und bis auf ein Restgewicht der Tröpfchen von 30 % getrocknet. Diese Tröpfchen werden mit LentiKat[®]Stabilizer vorsichtig überschichtet, die Linsen abgetrennt, mit LentiKat[®]Stabilizer zweimal für 10 min gewaschen. Die Linsen können nun in Produktionsmedium überführt werden.

4.5.1.5 Waschlösungen zum Waschen von LentiKats[®]

Die Waschlösung zum Befreien von LentiKats[®] von anhaftenden Medienbestandteilen und Zellen wurde als isoosmomolare Lösung hergestellt. Es wurde entsprechend der vorgelegten Substratkonzentration eine isoosmomolare Lösung aus NaCl hergestellt. NaCl ist nicht toxisch für die Zellen, übt schon in geringen Konzentrationen einen hohen osmotischen Druck aus und besitzt eine gute Löslichkeit. Bei der Bemessung des osmotischen Drucks wurde der osmotische

Druck des Hefeextrakts vernachlässigt. Eine isoosmomolare Lösung zu einer 400 g/L Saccharose enthaltenden Lösung enthielt 29,25 g/L NaCl.

4.5.2 Immobilisierung in Calcium-Alginat

4.5.2.1 Polymerlösung

Zur Herstellung der Polymerlösung wurde Alginat vom Typ Protanal LF 20/60 (Pronova, Oslo, N) eingesetzt. Das Natriumalginat wurde unter stetigem und kräftigem Rühren in 5 µS/cm Wasser eingerührt. Die Konzentration betrug 20 g/L.

4.5.2.2 Vernetzerlösung

Die Vernetzerlösung bestand aus in 5 µS/cm Wasser gelöstem $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$. Die Konzentration betrug 20 g/L.

4.5.2.3 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Vorkulturgefäß in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 4.000 g abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweifach mit 400 g/L Saccharose in 5 µS/cm Wasser gewaschen und danach in etwas dieser Lösung resuspendiert.

4.5.2.4 Herstellung von Kugeln

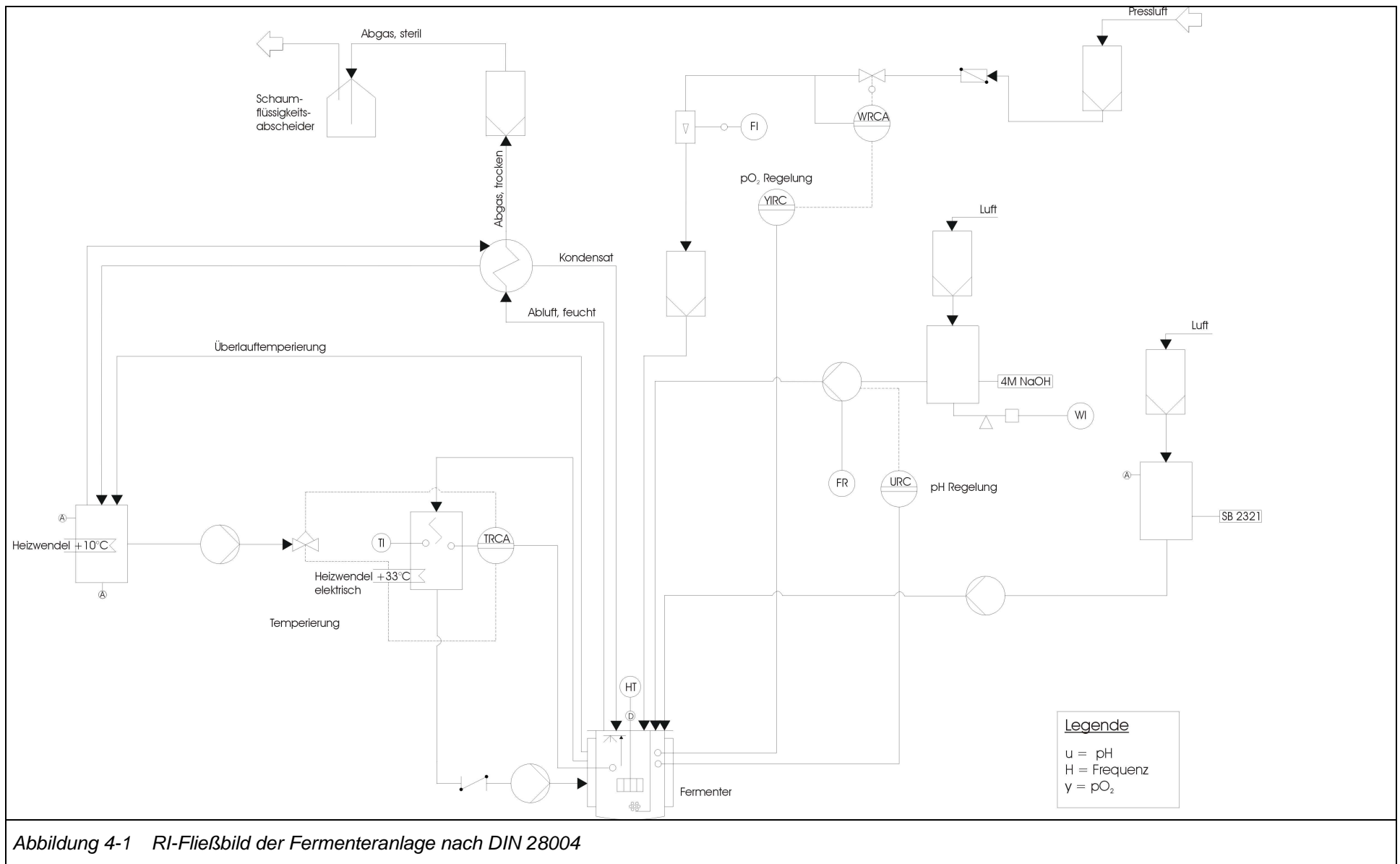
In die vollständig durchmischte Polymerlösung wurden die vorbereiteten Zellen zugegeben mit der Polymerlösung vermischt. Die Zellen werden dann in die Abtropfapparatur eingefüllt und dann in das Vernetzerbad abgetropft. Nach dem Abtropfen werden die Kugeln für 20 min in der Vernetzerlösung belassen, um sie vollständig aushärten zu lassen.

4.6 Fermentersystem

Das verwendete Fermentersystem stammt von der Firma INFORS (Bottmingen-Basel, CH). Es verfügt über zwei Glasfermentereinheiten, einen Master-Fermenter (5,5 L Arbeitsvolumen) und einen Satelliten-Fermenter (1,5 L Arbeitsvolumen), die über eine gemeinsame Elektronik geregelt werden können. Während der Satelliten-Fermenter mit einem Höhe-Durchmesser-Verhältnis (H/d) von 0,75 den üblichen Abmessungen (H/d=1) nach den deutschen Industrienormen ähnlich ist, weicht der Master-Fermenter mit einem h/d-Verhältnis von 2,27 bei gleichem Durchmesser deutlich davon ab. Beide Kessel verfügen über einen durchstoßfreien, magnetgekoppelten Rührantrieb mit Scheibenrührern und eine Doppelwand-Thermostatisierung. Die Abluftkühler werden im Gegenstromprinzip von einem externen Aggregat mit Kühlwasser durchströmt. Beide Fermenter können mit den geeigneten Einbauten im Rührkesselbetrieb oder im Umwurbetrieb geführt werden. Im Fermentersteuerungsblock integriert befinden sich die Pumpen für Laugen- und Schaumbekämpfungsmitteldosage.

In der nachfolgenden Abbildung 4-1 ist ein RI-Fließbild mit Grundinformationen des Fermenters dargestellt.

4 Material und Methoden



4.6.1 Fermentationssteuerung

Über die in der Mastereinheit integrierte Steuerelektronik können beide Einheiten geregelt werden. Die benötigten Funktionen wurden mit einem angeschlossenen PC über die INFORS-Software IRIS für Windows NT 4.0 angesteuert. Zusätzlich können mit dieser Software Messdaten aufgezeichnet und ausgewertet werden. Eine integrierte Skriptsprache ermöglicht den Aufbau komplexer Regelungen, wie sie zum Beispiel für die Belüftung beider Fermenter eingesetzt wurde.

4.6.1.1 Temperatur

Die Thermostatisierung der Fermenter erfolgte über einen Doppelmantel-Wasserkreislauf. Das Heizelement ist bei diesem System im Fermenterblock integriert und wird mit Kühlwasser eines externen Kühlaggregats automatisch gegengesteuert. Die Temperatur wird im Kessel mit einem Pt-100-Element gemessen. Die Steuerung erfolgte über die Standardeinstellungen der IRIS-Software.

4.6.1.2 pH-Wert

Der pH-Wert in den Fermentern wurde über autoklavierbare pH-Gelelektroden ermittelt. Für den Fall einer pH-statisierten Fermentation wurde über die Standardeinstellungen der IRIS-Software ausschließlich die Laugendosagepumpe geregelt, da auf Grund der Säurebildung des Pilzes SZ 101 der pH-Wert nur in eine Richtung korrigiert werden musste. Dosierte wurde 4 M Natronlauge aus einem Vorratsgefäß.

4.6.1.3 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck im Fermenter wurde über die Begasungsrate geregelt. Beide Fermenter verfügen über einen elektronisch geregelten Durchflussmesser mit Stellglied, der direkt über die IRIS-Software angesteuert werden kann. Dazu wurde in der softwareeigenen Skriptsprache eine mehrfach kaskadierte Regelung programmiert, die zum einen zweifach kaskadiert die Begasungsrate beeinflusste, zum anderen abhängig von der durchschnittlichen Begasungsrate das Grundbegasungsniveau an die Wachstumsverhältnisse anglich. Das Programmskript mit zahlreichen Erläuterungen ist im Anhang zu finden. Als Beispiel dient die bei den durchgeführten Versuchen angewendete Regelung zur Einhaltung eines Sauerstoffpartialdrucks von 5 %.

Das Skript wird im Intervall von zwei Sekunden durch die Software abgearbeitet, das heißt, die Messwerte werden aktualisiert und die sich daraus ergebenden Änderungen ausgeführt. Da sich hierdurch die Begasungsraten rasch ändern können, wurde eine Ober- und Untergrenze für die Begasungsrate festgelegt. Um ein Übersteuern des oberen Grenzwertes zu vermeiden kann im Bedarfsfall die Begasungsrate auf den unteren Grenzwert bzw. auf die Mindestbegasungsrate zurückgesetzt werden. Um einem gestiegenen Sauerstoffbedarf während der Wachstumsphase Rechnung zu tragen wurde eine dynamische Mindestbegasungsrate implementiert. Um im Falle eines zu hohen Sauerstoffpartialdrucks, meist beim Übergang des Wachstums in die stationäre Phase, die Mindestbegasungsrate senken zu können wurde eine entsprechende Funktion implementiert. Die Bewertungskriterien zum Anheben und Senken der Mindestbegasungsrate wurden so gewählt, dass dem exponentiellen Anstieg des

Sauerstoffbedarfs Rechnung getragen wird. So erfolgt eine Erhöhung etwa 10x schneller (mind. 100 s) als eine Senkung (mind. 1000 s).

4.6.2 Schaumbekämpfung

4.6.2.1 Schaumbekämpfungsmittelzugabe

Aufgrund der starken Schaumbildung wurde den Fermentationsansätzen Schaumbekämpfungsmittel in festen Intervallen zugeführt. Im Abstand von 120 Minuten erfolgte eine über die Software automatisierte Dosage von ca. 200 µL des Schaumbekämpfungsmittels Struktol SB 2321, SCHILL & SEILACHER, Hamburg. Die Schaumbildung konnte damit zumindest während der Startphase erfolgreich unterbunden werden. Erläuterungen zum Skript befinden sich im Anhang.

4.6.2.2 Intervall-Schaumbekämpfung

Zusätzlich zur chemischen Schaumbekämpfung wurde beim Master-Fermenter, der eine sehr starke Schaumbildung aufwies, eine Intervallschaltung zur Rührerdrehzahlerhöhung im Steuerungsskript programmiert. Im Abstand von 60 Minuten wurde die Drehzahl des Rührers für drei Minuten auf 900 UpM, bzw. bei extremer Schaumbildung auf 1000 UpM angehoben. In Kombination mit dem modifizierten Rührer zur Schaumberegnung (4.6.2.3) wurde der Schaum eingerührt, bzw. im flüssigen Zustand gehalten.

4.6.2.3 Mechanische Schaumbekämpfung

Für den Master-Fermenter wurde aufgrund der außergewöhnlich starken Schaumbildung während der Fermentation eine zusätzliche, mechanische Schaumbekämpfung eingeführt. Dazu wurde ein zweiter Scheibenrührer modifiziert und als Schaumberegner entwickelt, der nach dem Prinzip eines Staurohres funktioniert. Dieser wurde auf der Antriebswelle so montiert, dass die beiden unteren Enden der Staurohre in das Medium eintauchten. Die nachfolgende Abbildung 4-2 zeigt den Schaumberegner.

Die im folgenden durchgeführte Berechnung zeigt, dass eine grundsätzliche Funktionstüchtigkeit des Schaumberegners gegeben ist. Auf Grund dieser Daten wurde der Schaumberegner gefertigt und eingesetzt.

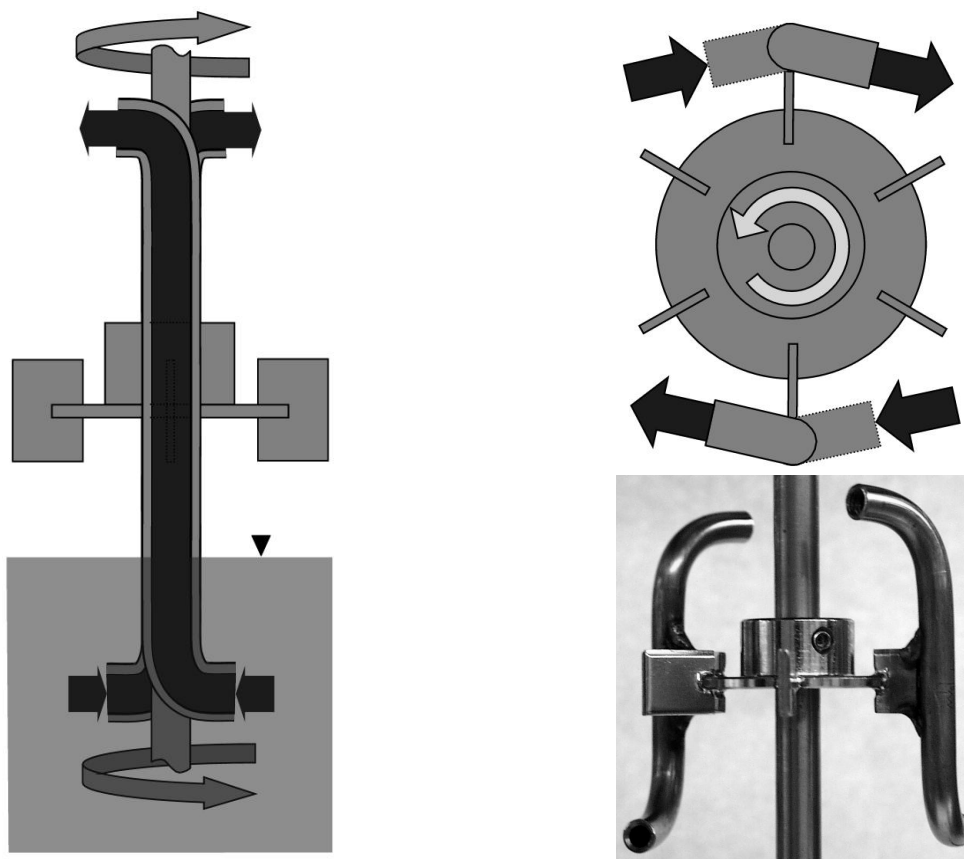


Abbildung 4-2 Schaumberegner in schematischer Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts oben). Die blauen Pfeile geben die relative Bewegungsrichtung der Flüssigkeit an. Das Bild rechts unten zeigt den auf der Rührerachse montierten Beregner.

Tabelle 4-18 Technische Maße des Schaumberegners und eingesetzte Stoffwerte

Symbol	Parameter	Wert	
d_{Rohr}	Steigrohrdurchmesser	0,004	m
d_{Trichter}	Aufweitung des eintauchenden Endes des Steigrohres	0,005	m
l_{Rohr}	Länge des Steigrohres	0,07	m
$r_{\text{Rührer}}$	Radius des Steigrohres	0,032	m
H	Höhendifferenz des Steigrohres	0,06	m
S	Eintauchtiefe des Steigrohres (Rohrmitte)	0,02	m
ρ	Dichte des Mediums (400 g/L Saccharose bei 33 °C)	1159,5	kg/m ³
η	Viskosität der Flüssigkeit (400 g/L Saccharose bei 33 °C) [87]	2,925	mPas

Für die Berechnungen wurde eine Lösung von 400 g/L Saccharose vorausgesetzt, welche auf 33 °C temperiert ist. Des Weiteren wurde die Rührerdrehzahl mit 900 UpM ($f = 15 \text{ s}^{-1}$) angenommen. Die Berechnungen wurden vereinfacht für ein statisches System, das heißt, Strömungseffekte beim Anfahren des Schaumzerstörers und Energieverbrauch zur Beschleunigung des Mediums wurden vernachlässigt.

Über die Rührerdrehzahl (= Umdrehungsfrequenz f) und den Radius des Steigrohrmittelpunktes ($d_{\text{Rührer}}$) kann auf die Bahngeschwindigkeit geschlossen werden.

Durch die Drehung des Schaumzerstörers im Medium entsteht im Steigrohr ein Staudruck, der die Flüssigkeit in das Rohr drückt. Das eintauchende Ende des Steigrohres wurde konisch angesenkt, um den Staudruck zu erhöhen und somit ein erhöhtes Volumen zu fördern. Für die Geschwindigkeit des Mediums im Steigrohr gilt die Kontinuitätsgleichung, die allerdings nur das Geschwindigkeitsverhältnis, nicht jedoch den tatsächlichen Wert ergibt. Die entgegen wirkenden Druckverluste sind der

Reibungsverlust im Rohr, der Druckverlust an den Krümmern und der Druckverlust durch die Höhendifferenz. Gleichung 4-1 zeigt den Zusammenhang zwischen Staudruck und den entgegenwirkenden Druckverlusten durch Rohrreibungen und Höhendifferenz.

$$\Delta p_{\text{resultierend}} = \Delta p_{\text{Staudruck}} - (\Delta p_{\text{Rohr}} + \Delta p_{\text{Krümmer}} + \Delta p_{\text{Höhe}})$$

Gleichung 4-1

$\Delta p_{\text{resultierend}}$	resultierender Druck	[Pa]
$\Delta p_{\text{Staudruck}}$	Staudruck	[Pa]
Δp_{Rohr}	Druckverlust im Steigrohr	[Pa]
$\Delta p_{\text{Krümmer}}$	Druckverlust in den 90°-Krümmungen	[Pa]
$\Delta p_{\text{Höhe}}$	Druckverlust durch die Höhendifferenz	[Pa]

Um die Geschwindigkeit der Flüssigkeit im Rohr zu ermitteln wird der resultierende Druck gleich Null gesetzt und die Gleichung nach v_1 umgestellt (Gleichung 4-2).

$$v_1 = \sqrt{\frac{v_2^2 - (H - S) \cdot 2 \cdot g}{\lambda \cdot \frac{l_{\text{Rohr}}}{d_{\text{Rohr}}} + \zeta_{90}}}$$

Gleichung 4-2

v_1	Geschwindigkeit des Mediums im Rohr	[m/s]
H	Höhendifferenz des Steigrohres	[m]
S	Eintauchtiefe des Steigrohres (Rohrmitte)	[m]
g	Erdbeschleunigung	[m/s ²]
λ	Reibungszahl	[-]
l_{Rohr}	Länge des Steigrohres	[m]
d_{Rohr}	Durchmesser des Steigrohres	[m]
ζ_{90}	Widerstandszahl für 90°-Krümmungen	[-]

Die sich ergebende Geschwindigkeit ist abhängig von der Reibungszahl, die ihrerseits von der vorherrschenden Strömung abhängt. Für die vorausgesetzte isotherm-stationäre Turbulenzströmung gibt es mit Annahme des Steigrohres als „glattes Rohr“ drei verschiedene für diesen Strömungsbereich zutreffende empirische Beziehungen zwischen der Reibungszahl λ und der Reynoldszahl. Tabelle 4-19 zeigt die möglichen Modelle.

Tabelle 4-19 Reibungszahlen isotherm-stationärer Turbulenzströmung in glatten Rohren nach [279].

Gleichung nach	Reibungszahl λ	Re-Bereich
H. Blasius	$0,3164 \cdot \text{Re}^{-0,25}$	2.320...100.000
R. Hermann	$0,0054 + 0,3964 \cdot \text{Re}^{-0,3}$	2.400...2.000.000
A. G. Kassatkin	$1,01 (\lg \text{Re})^{-2,5}$	4.000...6.000.000

Die Reynoldszahl für das strömende Medium wurde iterativ für jedes Modell berechnet. Die sich für die einzelnen Modelle ergebenden Werte liegen über dem kritischen Wert $\text{Re}_{\text{krit}} = 2320$, der den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung in Rohren angibt. Tabelle 4-20 gibt die berechneten Parameter wieder.

Tabelle 4-20 Für die angegebenen Modelle berechnete Parameter

Modell	Re [-]	Minstdrehzahl [min ⁻¹]	Geschwindigkeit im Rohr [m/s]
H. Blasius	2507	302	1,58
R. Hermann	2548	307	1,61
A. G. Kassatkin	2433	293	1,53

Die angewandten Modelle liefern sehr ähnliche Ergebnisse. Die Berechnungen zeigen, dass der Schaumberegnen im Betrieb Flüssigkeit fördern wird. Da es sich nur um eine Abschätzung handelt, kann nicht genau gesagt werden, welche

Mindestdrehzahl erforderlich ist. Die hier ermittelten Mindestdrehzahlen berücksichtigen nicht, dass sich beim Anfahren des Schaumberegners laminare Strömungsvorgänge abspielen. Bei dieser Strömungsart liegen veränderte Reibungszahlen vor. Es wird deshalb erwartet, dass eine Flüssigkeitsförderung erst ab höheren Drehzahlen als berechnet einsetzen wird.

Zu den weiteren Erwartungen zählen, dass der Schaumberegner die entstehende Schaumkrone kontinuierlich beregnet und somit ein Eintrocknen des Schaums verhindert. Des Weiteren sollte die Menge an durch die Beregnung gebildeten Sekundärschaums minimal sein, da die Beregnung radial und nicht vertikal erfolgt und somit ein Einschlagen der Tropfen in das Medium unterbleibt.

4.7 Versuchsvorbereitung

4.7.1 Schüttelkolbenversuche

Die Versuche wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Aluminium-Überwurfkappen durchgeführt. Die Glasgeräte wurden zunächst sterilisiert und vor Versuchsbeginn unter sterilen Bedingungen mit jeweils 48 mL Medium befüllt. Zum Versuchsstart wurde jeder Kolben mit 2 mL Vorkultur inokuliert. Über die Versuchsdauer wurden die Kolben bei 120 UpM und 33 °C inkubiert. Der Radius des Schüttlers betrug 25 mm.

4.7.2 Fermentationen

Die Saccharose wurde in 5 µS/cm Wasser vorgelöst und in den Fermenter eingefüllt, der anschließend 10 Minuten bei 121 °C sterilisiert wurde. Diese kurze Zeit war für eine Sterilisation ausreichend, da lange Aufwärm- und Abkühlzeiten die eigentliche Sterilisationszeit deutlich verlängerten. Die übrigen Medienbestandteile wurden ebenfalls in 5 µS/cm Wasser vorgelöst und dann unter sterilen Bedingungen in den Fermenter überführt. Dann erfolgte die Einstellung des Gesamtvolumens und ggf. des pH-Wertes mit 4 M Salzsäure. Über eine Zugabeflasche wurde die Fermentation mit dem entsprechenden Volumen an Vorkultur inokuliert.

4.8 Probenahme

4.8.1 Schüttelkolbenversuche

Bei den Probenahmen im Schüttelkolben wurde das Gewicht des Kolbens vor und nach jeder Probenahme ermittelt und der Gewichtsverlust durch Zugabe von entsprechenden Volumina 5 µS/cm Wassers ausgeglichen. Dieser Ausgleich überkompensiert jedoch auch die Verdunstung von gebildeten Ethanol und dem Abgehen von erzeugtem Kohlendioxid. Die sich dadurch ergebende Verdünnung der Kultur sichert, dass die ermittelten Produktkonzentrationen tatsächlich gebildet wurden und nicht durch Aufkonzentrierung zustande kommen. Es wurde jeweils 1 mL Kulturbrühe aseptisch entnommen und sofort weiterverarbeitet.

4.8.2 Fermentationen

Die Probenahme im Master-Fermenter erfolgte über ein Probenahmeröhrchen aus Glas, in das eine Pumpe die Fermentationsbrühe ansaugte. Über ein Septum wurden 3 mL dieser Brühe mit einer 5 mL-Spritze mit Kanüle (Ø 0,9 mm) aseptisch entnommen. Beim Satelliten-Fermenter wurde die Fermentationsbrühe mit einer sterilen 10 mL-Spritze direkt angesaugt und ebenfalls 3 mL als Probe entnommen. Beide Proben wurden in Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL) überführt und direkt weiterverarbeitet oder für die spätere Verwendung sofort bei –20 °C gelagert.

4.9 Bestimmung der Biotrockenmasse

4.9.1 Bestimmung der freien Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der freien Biomasse wurden 1,3 mL Kulturbrühe bei Fermentationen bzw. 1,0 mL bei Kolbenversuchen in zuvor gewogene 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 20.400 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und für die HPLC-Analytik in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C gelagert. Das Pellet wurde zur Entfernung von Medienbestandteilen einmal mit 1 mL Leitungswasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß bei –20 °C eingefroren. Nach Ablauf des Versuchs wurden alle Proben gemeinsam für mindestens 48 h bei Raumtemperatur im Vakuum-Exsikkator getrocknet und anschließend ausgewogen. Die Biotrockenmasse wurde nach Gleichung 4-3 ermittelt.

$$BTM = \frac{m_{\text{trocken}} - m_{\text{leer}}}{V_{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

BTM	Biotrockenmasse	[g/L]
m_{trocken}	Masse des Gefäßes mit trockenem Proberückstand	[g]
m_{leer}	Masse des leeren Gefäßes	[g]
V_{Probe}	Volumen der eingesetzten Probe	[L]

4.9.2 Bestimmung der Biotrockenmasse in Ca-Alginat-Immobilisaten

Aus dem Fermenter wird ein Probenvolumen von 5 mL entnommen und in ein 15 mL Probengefäß überführt. Die Probe wird vor der weiteren Bearbeitung tiefgekühlt. Nach dem Auftauen der in 15 mL-Probengefäße abgefüllten Proben wird auf diese ein eigens konstruierter Probengefäßdeckel mit einer Netzöffnung aufgeschraubt. Der Kulturüberstand wird über das Netz abgegossen und für die folgende Analytik weiterverarbeitet. Die Immobilisate bleiben im Falcon zurück und werden zweimal mit 5 mL Leitungswasser gewaschen. Anschließend werden die Alginatperlen in einem Gesamtvolumen von 10 mL mit Citratpuffer (0,3 M) aufgelöst. 1,0 mL dieser Probe wird für eine herkömmliche BTM-Bestimmung nach 4.9.1 eingesetzt.

4.10 HPLC Analytik

4.10.1 Probenvorbereitung

Nach Ablauf eines Versuches wurden die bei –20 °C gelagerten Proben bei Raumtemperatur 30 Minuten aufgetaut und durch Schütteln sichergestellt, dass ein

homogenes Gemisch vorlag. In einer 1:10 und einer folgenden 1:20-Verdünnung mit Reinstwasser wurden die Proben zu ihrer Verwendung für die HPLC-Analytik in eine 1:200 Gesamtverdünnung überführt. Es wurde an dieser Stelle kein Laufmittel (5 mM H_2SO_4) verwendet, um die Hydrolyse der enthaltenen Saccharose zu Glucose und Fructose zu minimieren. Die Proben wurden im Anschluss entweder direkt analysiert oder bis zu ihrer Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.10.2 Kohlenhydratanalytik

Die Proben wurden auf Saccharose, Glucose, Fructose, Ribit, Erythrit, Glycerin und Ethanol untersucht. Dazu wurde das in Tabelle 4-21 aufgeführte HPLC-System verwendet.

Tabelle 4-21 Komponenten des verwendeten HPLC-Analytiksystems.

Komponenten	Hersteller bzw. Einstellungen
Entgaser	Degasys DG-1300, Uniflows, Japan
Pumpe	BioLC Gradient Pump, Dionex, USA
Autosampler	Marathon Basic, Spark, NL, mit 10 μL Probeschleife
Säule	Aminex® HPX87H+, 300 mm x 8 mm, Biorad, auf $20\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert
Refraktionsindexdetektor	Shodex RI SE-51, Showa Denko, Japan
Datenaufnahme	CBM, Shimadzu, Japan
Datenverarbeitung	LC-10 Software, Shimadzu, Japan

Der Betrieb erfolgte bei einem konstanten Fluss von $0,6\text{ mL/min}$. Als Laufmittel wurde 5 mM Schwefelsäure eingesetzt. Um eine Hydrolyse von Saccharose bei dem vorherrschenden pH-Wert von pH 3 zu minimieren, wurde die Säule auf $20\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein typisches HPLC-Diagramm des verwendeten Mischstandards mit den Metaboliten Saccharose, Glucose, Fructose, Ribit, Erythrit, Glycerin und Ethanol.

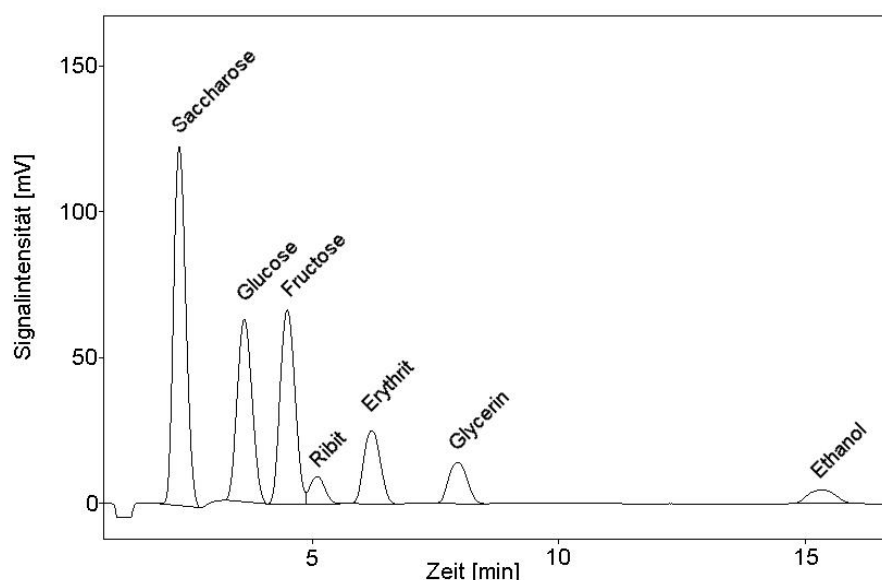


Abbildung 4-3 Typisches HPLC-Diagramm

Um einen Vergleich der Ergebnisse zu anderen Untersuchungen mit Glucose als Substrat zu erleichtern und um die Übersichtlichkeit der Diagramme zu verbessern wurde Saccharose in Glucoseäquivalente umgerechnet. Fructose wird von dem Pilz SZ 101 auf demselben Wege metabolisiert und verfügt über das gleiche Molekulargewicht wie Glucose und stellt somit ebenfalls ein Glucoseäquivalent dar.

$$\text{Glucoseäq.} = c_{\text{Saccharose}} \cdot \frac{2 \cdot 180,16 \text{ g/mol}}{342,30 \text{ g/mol}} + c_{\text{Glucose}} + c_{\text{Fructose}} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

Glucoseäq.	Glucoseäquivalente	[-]
$c_{\text{Saccharose}}$	Konzentration von Saccharose	[g/L]
c_{Glucose}	Konzentration von Glucose	[g/L]
c_{Fructose}	Konzentration von Saccharose	[g/L]
Molare Masse von Saccharose	342,30 g/mol	
Molare Masse von Glucose und Fructose	180,16 g/mol	

4.10.3 Ammoniumanalytik

Zur Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehalts wird der Küvettentest LCK 303 der Firma DR. LANGE verwendet. Das Prinzip beruht auf der Reaktion von Ammoniumionen mit Hypochloritionen und Salicylonen bei pH 12,6 in Gegenwart von Nitroprussid-Natrium als Katalysator zu Indophenolblau. Diese Farbreaktion ist stark temperaturabhängig, weshalb der Test bei einer Arbeitstemperatur von 20 °C durchgeführt werden muss. Nach einer Inkubationszeit von 15 min werden die unverdünnten Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 695 nm mit dem Photometer ISIS 9000 (DR. LANGE) analysiert.

4.10.4 Nitrat- und Nitritanalytik

Der Probenüberstand nach der Separation der Zellen wird 1:5 in Reinstwasser verdünnt und auf eine Reversed-Phase HPLC-Säule aufgegeben. Die Detektion von Nitrat und Nitrit erfolgt mittels eines UV-Detektors bei 210 nm. Der hydrophobe Teil des Octylamins interagiert mit der apolaren Säule während die bei einem pH-Wert von 6,5 protonierten Aminogruppen mit den Nitrat- und Nitriten wechselwirken. Tabelle 13 beschreibt die Betriebsparameter des Systems.

Tabelle 4-22 Komponenten des verwendeten HPLC-Analytiksystems für die Untersuchung von Nitrat und Nitrit.

Komponenten	Hersteller bzw. Einstellungen
Laufmittel	5 % Methanol, 0,2 % Octylamin in Wasser, pH 6,5 mit H ₃ PO ₄ eingestellt
Entgaser	Degasys DG-1310, UNIFLOWS
Pumpe	High Precision Pump Model 300 C, GYNOTEK, 2 ml/min
Autosampler	Promis, SPARK HOLLAND, 5 µl Probenschleife
Säule	Hypersil ODS, 3 µm, 60 x 4,6 cm, Raumtemperatur
UV-Detektion	2151 Variable Wavelength Detector, LKB, λ=210 nm
Datenaufnahme und -verarbeitung	Class LC-10 Software, SHIMADZU, Japan

4.11 Bestimmung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des pH-Werts in Schüttelkolben wurde nach Entnahme und Abzentrifugieren der Probe ein Aliquot des Überstandes auf ein pH-Teststreifen aufgebracht. Verwendet wurden Teststreifen (Fa. MACHERY-NAGEL) mit einem Anzeigebereich von pH 0,0 bis 6,0, bzw. pH 2,0 bis 9,0.

Bei den Fermentationen wurde der pH-Wert über autoklavierbare pH-Gelelektroden bestimmt. Zum Einsatz kamen Modelle der Fa. METTLER-TOLEDO und der Fa. QIS. Die Messwerte wurden mittels IRIS-Software über den angeschlossenen PC aufgezeichnet. Vor jeder Fermentation wurden die pH-Elektroden mindestens 30 Minuten equilibriert, bevor sie mit den Pufferlösungen pH 7,0 und pH 4,0 kalibriert wurden.

4.12 Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks

Der Sauerstoffpartialdruck in den Fermentern wurde über autoklavierbare pO_2 -Elektroden ermittelt. Die Messwerte wurden mittels IRIS-Software über den angeschlossenen PC aufgezeichnet. Vor Verwendung der Elektroden wurden diese mindestens 6 Stunden polarisiert. Nach jeder zweiten Fermentation erfolgte ein Wechsel der Elektrolytflüssigkeit und eine mechanische und augenscheinliche Kontrolle der Membran.

4.13 Mikroskopische Untersuchungen

Die Fermenterproben wurden täglich im Phasenkontrastmikroskop (Axioplan, Fa. ZEISS, Zeiss, Oberkochen) auf Kontaminanten untersucht. Dazu wurden Nativpräparate bei einer 100-fachen Vergrößerung unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektives untersucht. Bei Schüttelkolbenversuchen wurde bei Verdacht der Kontamination und nach Beendigung des Versuches von jedem Kolben ein Nativpräparat wie zuvor beschrieben untersucht.

4.14 Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ

Vor weitergehenden Berechnungen wurden die Daten der BTM-Kurven mit Hilfe der Software Origin[®] durch einen Boltzman-Fit geglättet. Die Wachstumskonstanten der Kultur können aus der exponentiellen Phase der Wachstumskurve ermittelt werden. Da der verwendete Stamm weder Pellets bildete noch flokulierte, kann das exponentielle Wachstum nach der Monod-Kinetik angenommen werden. Nach Umstellen und Integration ergibt sich Gleichung 4-5:

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_2}{X_1}}{t_2 - t_1} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

X	Konzentration der Biomasse	[g/L]
t	Zeit	[h]
μ	spezifische Wachstumsrate	[1/h]

Ausgeglichenes Wachstum vorausgesetzt, kann mit Hilfe der spezifischen Wachstumsrate nach Gleichung 4-6 die Verdoppelungsrate ermittelt werden.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

t_d	Verdoppelungsrate	[h]
μ	spezifische Wachstumsrate	[1/h]

4.15 Bestimmung der spezifischen Produktbildungsrate π

Vor weitergehenden Berechnungen wurden die Daten der Erythrit-Kurven mit Hilfe der Software Origin[®] durch einen Boltzman-Fit geglättet. Ist die Produktbildung Wachstum assoziiert, so ergibt sich nach Umstellung und Integration Gleichung 4-7:

$$\pi = \frac{1}{X} \cdot \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1}$$

Gleichung 4-7

π	spezifische Produktbildungsrate	[1/h]
X	Konzentration der Biomasse	[g/L]
P	Konzentration des Produkts	[g/L]
t	Zeit	[h]

4.16 Bestimmung der Ausbeute

Die Masse-Ausbeute der Erythritbildung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Y_{P/S} = \frac{m_{\text{gebildetes Erythrit}}}{m_{\text{verbrauchtes Substrat}}} \cdot 100$$

Gleichung 4-8

$Y_{P/S}$	Ausbeute (w/w)	[% (w/w)]
$m_{\text{gebildetes Erythrit}}$	Masse des gebildeten Erythrits	[g/L]
$m_{\text{verbrauchtes Substrat}}$	Masse des verbrauchten Substrats	[g/L]

Im Metabolismus des Pilzes SZ 101 kann theoretisch für jedes Mol Glucoseäquivalent 1 Mol Erythrit gebildet werden (siehe Abbildung 3-20). Für das vorliegende Substrat Saccharose (ein Glucosemolekül und ein Fructosemolekül) und das Produkt Erythrit ergibt sich damit eine maximale Mol-Ausbeute von 200 % und eine maximale Masse-Ausbeute von 67,8 %.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Medienuntersuchungen

In diesen Versuchen wurden grundlegende Untersuchungen zur Verwertung von Substraten und zur Einflussnahme von unterschiedlichen Medienbestandteilen vorgenommen.

5.1.1 Einfluss der Kohlenstoffquelle

Die mögliche Verwendung von kostengünstigen und gut verfügbaren Kohlenstoffquellen stellt für die Wirtschaftlichkeit eines biotechnischen Prozesses einen wichtigen Punkt dar. Im Rahmen einer nachhaltigen Produktion wäre die Verwertung von Rohstoffströmen wünschenswert, die Vorstufen für ein Endprodukt darstellen einer höheren Wertigkeit darstellen oder als Abfallströme angesehen werden.

5.1.1.1 Einfluss der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Untersucht wurden die Kohlenstoffquellen Dicksaft, Rohzuckerkläre und Saccharose als Produkte der Rübenzuckerherstellung sowie Palatinosemutterlauge, Palatinosemutterlaugehydrolysat (Salzsäurehydrolysate bei 25 °C und 70 °C), Palatinose und Trehalulose als Produkte der Palatinoseherstellung. Diese kamen zum Einsatz in Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nach 4.4.3. Die für Saccharose als Substrat erzielten Ergebnisse stellen die besten Ergebnisse dieser Versuchsreihe dar und entsprechen denen aus Voruntersuchungen [1]. Die anderen Substrate erbrachten deutlich geringere Erythritendkonzentrationen und Ausbeuten (Tabelle 5-1). Das scheinbare Ausbleiben der Nebenproduktbildung ist auf die langen Kultivierungsdauern zurückzuführen, durch die Glycerin und Ethanol wieder als Substrat verwandt werden beziehungsweise Ethanol verdampft. Eine Ausnahme bildet hierbei Rohzuckerkläre als Substrat, die beim Erreichen des maximalen Erythritgehalts Glycerin in höherer Konzentration als Erythrit aufweist. Gründe für dies schlechte Abschneiden dieser rohen Substrate sind in deren Verunreinigungen zu suchen. Saccharose stellt ein sehr reines Produkt dar, wohingegen Rohzuckerkläre und Dicksaft noch hohe Gehalte an Salzen und organischen Verunreinigungen enthalten. Palatinosemutterlauge besteht aus einer Mischung von Palatinose, Trehalulose, Isomelezitose, Saccharose, Glucose und Fructose. Saccharose wird viel besser als die Disaccharide Palatinose, Trehalulose und Isomelezitose verwertet. Die Enzymausstattung von SZ 101 bewerkstelligt zwar die Spaltung von Trehalulose und Palatinose, jedoch ist die Aktivität der Spaltung sehr niedrig, dass keine schnelle Bildung von Erythrit möglich ist. Die Hydrolysate der Palatinosemutterlauge wurden durch saure Hydrolyse mit Salzsäure vorgenommen. Dadurch sollen die enthaltenen Disaccharide in die Monomere Glucose und Fructose aufgespalten werden. Die auf diese Weise hergestellten Hydrolysate weisen deutliche Verfärbungen auf, die auf Zersetzungsprozesse hinweisen. Diese Produkte konnten nicht charakterisiert werden und sind für SZ 101 möglicher Weise nicht verwertbar.

Da sich Saccharose als Substrat mit den besten Eigenschaften für die Kultivierung herausgestellt hat, werden die weiteren Versuche mit Saccharose als primärer Kohlenstoffquelle durchgeführt.

5.1.1.2 Substrataufnahmeverhalten

Tabelle 5-1 In den Ansätzen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Versuchsbedingungen nach 4.4.3, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.

Kohlenstoffquelle [g/L]	Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM ³ [g/L]
Saccharose	175	46	193	14	0	32
Rohzuckerkläre	65	16	359	70	0	k.A.
Trehalulose	57	16	359	0	0	k.A.
Palatinose	55	13	359	0	0	k.A.
Palatinosemutterlauge	49	29	170	0	0	k.A.
Dicksaft	23	13	330	0	0	k.A.
PML Hydrolysat 70 °C	22	25	112	0	0	k.A.
PML Hydrolysat 25 °C	0	0	136	67	0	k.A.

Die Aufnahme von Glucose als Substrat ist in vielen Veröffentlichungen gut untersucht worden [280;281;282]. Saccharose als Disaccharid aus Glucose und Fructose muss erst in die Monosaccharide aufgespalten werden, um in den Pentosephosphatweg eingespeist zu werden (siehe Abbildung 3-20). Fructose muss erst in Glucose durch eine Epimerase umgewandelt werden, bevor sie verbraucht werden kann. Für diesen Versuch wurden Medium und Versuchsbedingungen nach 4.4.1 gewählt.

Betrachtet man Abbildung 5-1 so ist festzustellen, dass zu Beginn der Kultivierung eine rasche Abnahme der Saccharosekonzentration zu beobachten ist. SZ 101 muss über ein entsprechendes enzymatisches System zur Hydrolyse von Disacchariden verfügen, sonst wäre ein Wachstum auf Saccharose nicht möglich. Die aus der Hydrolyse entstehende Glucose wird sofort verbraucht. Da Fructose im Stoffwechsel gegenüber Glucose einen zusätzlichen Schritt benötigt, um in den Pentosephosphatweg eingeschleust zu werden, reichert es sich im Zellinneren an. Fructose wird von SZ 101 wieder ausgeschieden. Dieser Schritt ist jedoch nicht vollständig selektiv, da mit der Fructose ebenfalls Glucose ausgeschüttet wird. Die ausgeschüttete Glucose wird gegenüber der Fructose bevorzugt wieder aufgenommen. Für Glucose und Fructose können einzelne Konzentrationspeaks im Medium ausgemacht werden.

Durch das schnelle Aufnehmen der Saccharose und dem Ausscheiden von Glucose und Fructose ergeben sich durch die Berechnung der Glucoseäquivalente Plateauphasen oder ein Ansteigen der Kohlenhydratkonzentration im Medium. Für die genaue Beurteilung der Substratversorgung sind daher Messungen aller Substrate notwendig. Dennoch wird in den in dieser Arbeit gezeigten Diagrammen fast ausschließlich der Substratverlauf in Glucoseäquivalenten angegeben. Die Übersichtlichkeit und die Berechnung der Ausbeute wird hierdurch stark vereinfacht. Sind in einem Medium unterschiedliche Substrate vorhanden, so können diese unterschiedlich bevorzugt aufgenommen werden. Muss ein Substrat erst in eine verwertbare Form umgewandelt werden oder hat sie einen niedrigeren Energiegehalt, so ändert sich die Kulturkinetik. Eigene Untersuchungen an SZ 101 haben ergeben, dass ein diauxisches Verhalten mit den Substraten Saccharose und den Spaltungsprodukten Glucose und Fructose nicht auftritt. Es werden keine Unterschiede im Produktbildungsverhalten und in der Biomassebildung beobachtet.

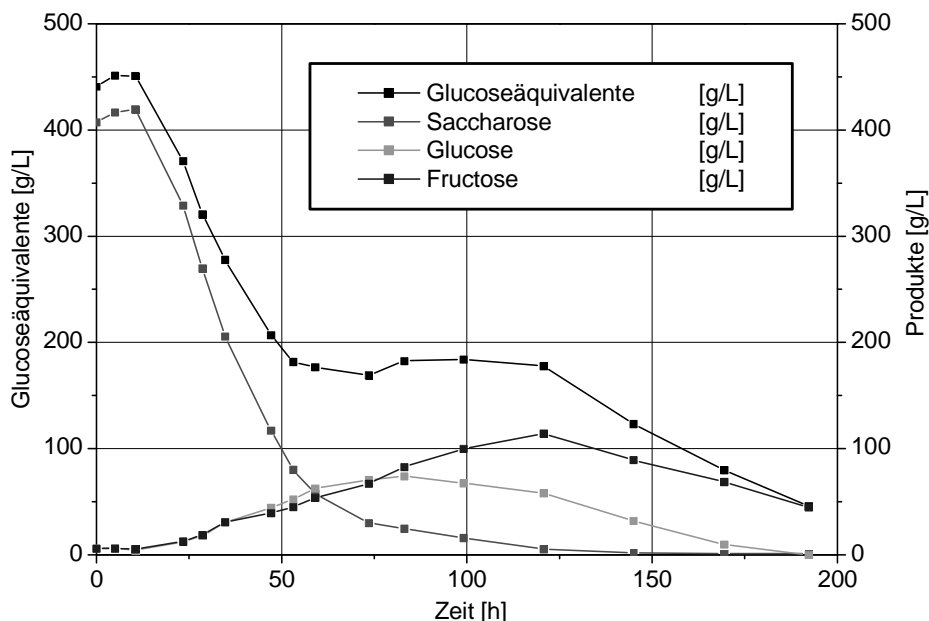


Abbildung 5-1 Verlauf der Einzelsubstrate und der Glucoseäquivalente. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

5.1.2 Einfluss der Stickstoffquelle

Für die technische Herstellung von Erythrit ist die Wahl der geeigneten Stickstoffquelle in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Die Zusammensetzung des stickstoffhaltigen Substrats hat Einfluss auf die Ausbeute, Selektivität, Produktivität und somit auf das zu wählende Verfahren hinsichtlich der Prozessführung und der Aufarbeitung. Letztendlich wird die Wahl des entsprechenden Substrates durch seinen Preis und seine Auswirkungen auf das Verfahren bestimmt.

Komplexe Nährmedienzusätze tragen oft den gleichen Namen, unterscheiden sich jedoch in ihren Zusammensetzungen. Für die mikrobielle Herstellung eines Produktes ist die genaue Zusammensetzung eines Substrates entscheidend, schon kleine Abweichungen können den Unterschied zwischen einer erfolgreichen oder misslungenen Produktbildung ausmachen. Eine exakte Aussage darüber zu treffen, warum ein Substrat zu einem besseren Ergebnis führt als ein anderes, ist sehr schwer zu treffen. Komplexe Substrate als Medienbestandteile bestehen aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Mineralstoffen, Kohlenhydraten, Vitaminen, Fetten und Aminosäuren. Die genauen Zusammensetzungen der komplexen Medienbestandteile sind nur in den seltensten Fällen genau bekannt. Führt die Substraterhöhung zu einer Verbesserung des Ergebnisses, so kann im Allgemeinen davon ausgegangen werden, dass ein oder mehrere Stoffe in einer zu niedrigen Konzentration vorliegen und eine limitierende Wirkung ausüben. Führt eine Erniedrigung zu einer Verbesserung des Ergebnisses, so kann davon ausgegangen werden, dass ein oder mehrere Stoffe in zu hoher Konzentration vorliegen und eine Hemmwirkung ausüben. Bei gleichzeitiger Hemmung und Limitierung ist eine Aussage jedoch kaum möglich, da die Effekte sich gegenseitig überlagern, verstärken oder abschwächen können.

5.1.2.1 Einfluss unterschiedlicher Stickstoffquellen

Unterschiedliche Substrate haben unterschiedliche Auswirkungen auf die mikrobielle Bildung von Erythrit. Untersucht wurden insgesamt sechs Stickstoffquellen, davon waren drei Hefeextrakte sowie jeweils ein Maisquellpulver, ein Maisquellwasser und

Rübenzuckermelasse. Diese kamen zum Einsatz in Medien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen und Versuchsbedingungen nach 4.4.4.

Der Vergleich der untersuchten Metabolite in Tabelle 5-2 zeigt einen deutlichen Einfluss der unterschiedlichen Stickstoffquellen auf die Bildung von Erythrit sowie Glycerin und Ethanol. Die Hefeextrakte von MERCK und OHLY ergaben besonders hohe Erythritkonzentrationen. Das Maisquellwasser von MARCOR zeigte ebenfalls gute Erträge, jedoch war zum Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration das Substrat noch nicht vollständig umgesetzt, zudem ist die Produktivität nur etwa halb so groß wie beim Einsatz von MERCK-Hefeextrakt. Die anderen untersuchten Substrate eignen sich nicht für die technische Herstellung von Erythrit, da sie zu geringe Erträge erzielen.

Betrachtet man die Eignung der Substrate unter dem Aspekt der Selektivität, so fällt auf, dass ausschließlich der Hefeextrakt von OHLY zum Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration kein Glycerin gebildet hat. In Hinsicht auf eine spätere Aufarbeitung ist dies ein sehr interessanter Punkt, da hierdurch ein weiterer Trenngang, z.B. in Form von Chromatographie, erspart werden kann oder eine vereinfachte Kristallisationsführung ermöglicht werden könnte. Allen untersuchten Substraten ist gemein, dass bei Erreichen der maximalen Erythritkonzentration kein Ethanol mehr in der Kulturbrühe vorzufinden war.

Für die weiteren Arbeiten wurde Hefeextrakt von MERCK ausgewählt, da mit diesem die höchsten Erythritkonzentrationen und –ausbeuten sowie Produktivitäten erzielt wurden.

Tabelle 5-2 In den Ansätzen mit verschiedenen Stickstoffquellen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Versuchsbedingungen nach 4.4.4, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ °C}$, 120 UpM.

Stickstoffquelle	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
Hefeextrakt, Merck	185	61	126	14	0	23
Hefeextrakt, Ohly	158	39	195	0	0	22
Maisquellpulver, Marcor	137	35	230	21	0	22
Maisquellwasser, Sigma	55	18	219	30	0	15
Hefeextrakt, Hartge	39	16	230	21	0	12
Rübenzuckermelasse, Südzucker	19	15	219	8	0	7

5.1.2.2 Einfluss der Hefeextraktkonzentration

Der in 5.1.2.1 für die weitere Untersuchung ausgewählte Hefeextrakt von MERCK wurde weiter untersucht. Hierfür wurde die Konzentration des Hefeextraktes im Bereich von 10 – 50 g/L nach 4.4.5 variiert und die dort beschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten.

Die Erythritbildung nimmt mit zunehmender Hefeextraktkonzentration zuerst wenig und im weiteren Verlauf stark ab (Abbildung 5-2, Tabelle 5-3). Gleichfalls erhöht sich die Menge an nicht abgebauten Glucoseäquivalenten. Der pH-Wert zeigt ebenfalls mit zunehmender Hefeextraktkonzentration einen weniger in den sauren Bereich tendierenden Verlauf.

Die Produktivität nimmt schon bei einer geringen Erhöhung der Hefeextraktkonzentration stark zu. Bei 15 g/L Hefeextrakt ist die Produktivität

gegenüber 10 g/L nahezu verdoppelt. Im Folgenden wird die maximale Erythritbildung zwar innerhalb der gleichen Zeitspanne wie in der des Ansatzes mit 15 g/L erreicht, jedoch fällt die Erythritkonzentration stetig, so dass die Produktivität gleichsam stark abfällt.

Vergleicht man die Nebenproduktbildung der Ansätze mit 10 und 15 g/L Hefeextrakt, so fällt auf, dass mit 15 g/L Hefeextrakt geringfügig mehr Glycerin und deutlich mehr Ethanol gebildet werden. Die Biomassebildung ist im Ansatz mit 15 g/L Erythrit knapp ein Drittel niedriger als im Ansatz mit 10 g/L. Eine verminderte Biomassebildung bedeutet, dass im Verlauf der Aufreinigung des Produktes die Apparate zur Abtrennung der Biomasse geringer dimensioniert werden können. Dadurch können Kosten eingespart werden.

Da die Produktivität und Ausbeute bei einer Hefeextraktkonzentration von 15 g/L für alle Ansätze die höchsten Werte aufweist, wird für die nachfolgende Optimierung Hefeextrakt in einer Konzentration von 15 g/L eingesetzt.

Untersuchungen zum Einfluss von Hefeextraktkonzentrationen im Bereich von 1-10 g wurden mit LentiKats[®] durchgeführt und sind unter 5.5.1 beschrieben.

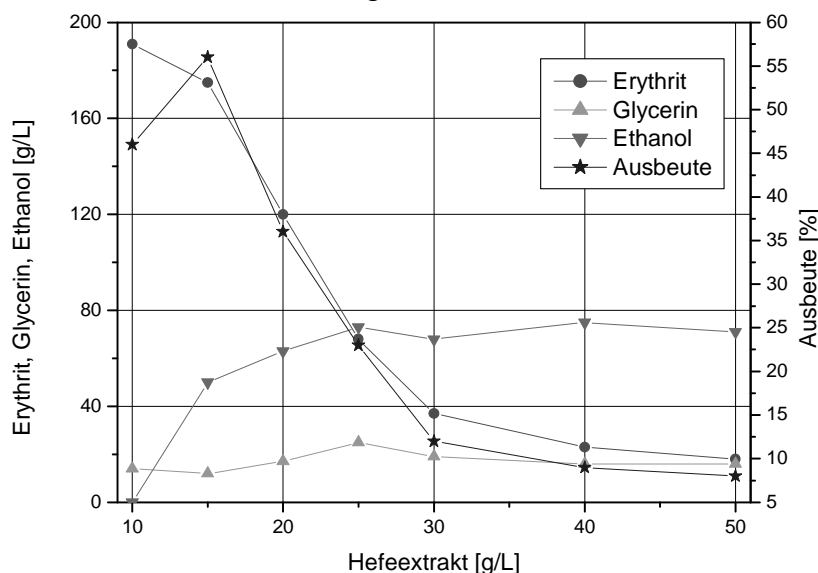


Abbildung 5-2 Auswirkungen unterschiedlicher Hefeextraktkonzentrationen auf die Erythritbildung. Nicht gezeigt: 100 g/L und 250 g/L Hefeextrakt. Versuchsbedingungen nach 4.4.5, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-3 In den Ansätzen mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Hefeextrakt [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
10	191	46	193	14	0	32
15	175	56	101	12	50	22
20	120	36	101	17	63	20
25	65	23	101	25	73	18
30	37	12	101	19	68	15
40	23	9	101	16	75	11
50	18	8	101	16	71	10
100	38	8	332	15	32	38
250	23	4	356	14	27	9

5.1.2.3 Stickstoffersatz im Hefeextrakt durch Ammoniumchlorid

Hefeextrakt stellt einen bedeutenden Kostenfaktor für die Herstellung von Erythrit dar. Um die Kosten für die Herstellung zu senken, wurde der Ersatz des Stickstoffs in Hefeextrakt durch Ammoniumstickstoff untersucht. Hierfür wurden Medien nach 4.4.6 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Dabei wurde die in 5.1.2.2 festgestellte Konzentration von 15 g/L Hefeextrakt zur maximalen Bildung von Erythrit herangezogen, um den Stickstoff zu ersetzen.

Mit abnehmender Hefeextraktkonzentration steigt zunächst die Erythritkonzentration an und durchläuft bei einem Hefeextraktgehalt von 7,5 g/L (50 % des ursprünglichen Stickstoffs im Hefeextrakt durch Ammoniumchlorid ersetzt) ein Maximum an gebildetem Erythrit und Ausbeute (Abbildung 5-3, Tabelle 5-4). Die hier erreichte Ausbeute von 60,6 % stellt einen sehr hohen Wert dar, das theoretische Maximum liegt bei 67,8 % (w/w). Bei weiter sinkender Hefeextraktkonzentration fällt die Erythritkonzentration rasch ab. Im Bereich einer Hefeextraktkonzentration von 7,5 – 12 g/L ist das Glycerin zum Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration bereits wieder vollständig abgebaut. In fast allen Ansätzen ist das gebildete Ethanol ebenfalls wieder abgebaut.

Die in diesem Versuch gewonnen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass im Hefeextrakt hemmende als auch limitierende Substanzen vorhanden sind. Da die Stickstoffmenge in den Ansätzen konstant gehalten wird, kann eine Limitierung durch Stickstoff nicht vorliegen. Dies bedeutet, dass einer oder mehrere Substanzen sich hemmend auf die Erythritbildung auswirken. Das Vorliegen eines Maximums bedeutet aber auch, dass zumindest ein weiterer Stoff in limitierender Konzentration im Hefeextrakt vorhanden ist.

Das teilweise Ersetzen von Hefeextrakt durch Ammoniumchlorid senkt die Rohstoffkosten und erleichtert die Aufarbeitung des Produktes, da kein Glycerin gebildet wird.

Das Fermentationsmedium mit einer Stickstoffquelle in Form von 7,5 g/L Hefeextrakt (Merck) und 28,7 g/L Ammoniumchlorid liefert mit 60,6 % Ausbeute bei einer Erythritkonzentration von 215 g/L und keinem Glycerin ein ideales Ergebnis für die Herstellung von Erythrit.

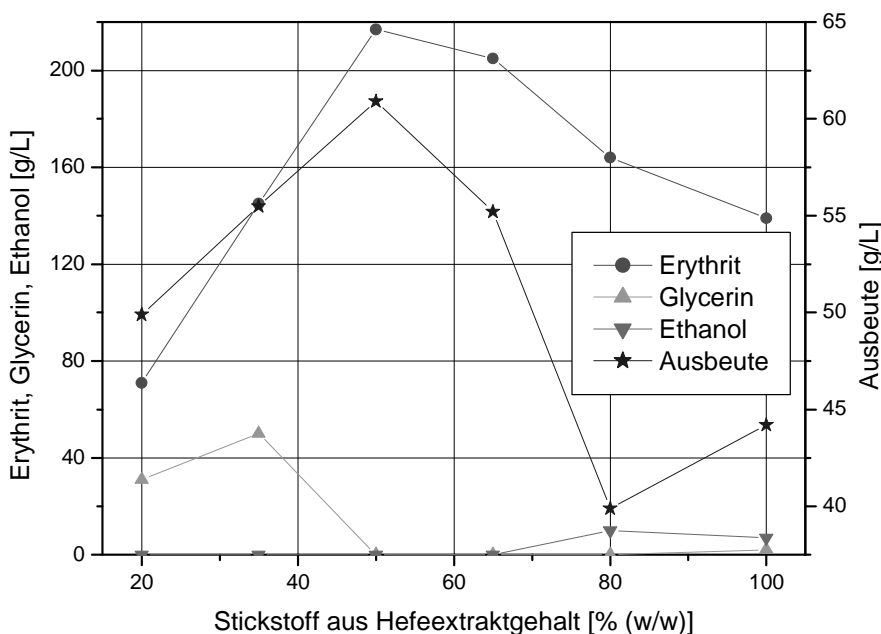


Abbildung 5-3 Einfluss des Stickstoffaustauschs in Hefeextrakt durch Ammoniumstickstoff. Versuchsbedingungen nach 4.4.6, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-4 In den Ansätzen mit verschiedenen Ammonium- und Hefeextraktkonzentrationen erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Hefeextrakt / NH ₄ Cl [g/L]	Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y ^P / _S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
15 / 0,0	139	44,2	189	2	7	41
12 / 11,5	164	39,9	189	0	10	46
9,8 / 20,2	205	55,2	237	0	0	44
7,5 / 28,7	215	60,6	212	0	0	42
5,3 / 37,4	145	55,5	212	50	0	43
3,0 / 45,8	71	49,9	237	31	0	34

5.1.2.4 Gülle als Substrat

Gülle ist ein in jedem Landschaftsstrich in Europa vorkommender Rohstoff, der reich an Nährstoffen und zu niedrigen Kosten beziehbar ist. Separierte Rindergülle hat einen Trockensubstanzgehalt von 5 % (w/w), daher ist zu erwarten, dass eine hohe Menge an Gülle eingesetzt werden muss. Es wurden Medien nach 4.4.8 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten, um den Bereich zwischen 140 – 739 g/L an zu untersuchen, als Referenz dient eine Kultur mit 15 g/L Hefeextrakt (MERCK) als Stickstoff und Supplinquelle bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen. Gülle enthält einen größeren Anteil von Stickstoff in Form von Ammonium als andere Substrate.

Da die Rindergülle einen hohen Anteil an nicht löslichen Feststoffen mit sich trägt, ist die Biomassebestimmung in einigen Fällen nicht möglich oder nur sehr unzuverlässig.

Mit steigender Güllekonzentration nimmt die Erythritbildung und die Ausbeute an Erythrit zu (Abbildung 5-4, Tabelle 5-5). In der höchsten Dosierung von Gülle wird zugleich die höchste Produktivität erzielt. In allen Ansätzen mit Gülle ist bei Erreichen der maximalen Erythritkonzentration das Ethanol abgebaut. In allen Kulturen mit Gülle ist jedoch auch nach sehr langer Kultivierungsdauer noch Glycerin vorhanden. Insgesamt ist die Erythritbildung mit Gülle zwar prinzipiell möglich, aber die Produktivitäten sind zu niedrig um wirtschaftlich interessant zu sein. Zudem wird die Aufarbeitung durch die hohe Konzentration von störenden Substanzen in der Gülle wesentlich erschwert werden.

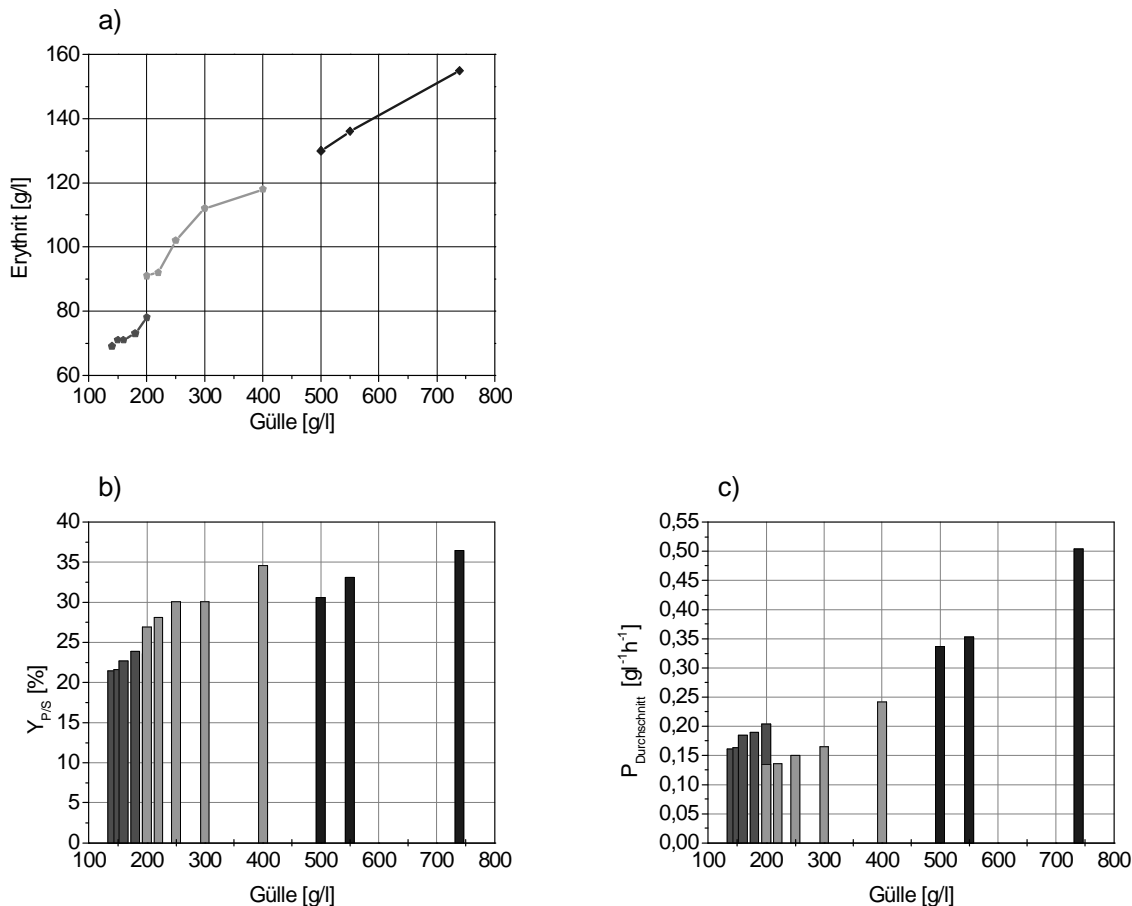


Abbildung 5-4 Auswirkungen von verschiedenen Güllekonzentrationen auf die Produktbildung. (a) Erythritkonzentration, (b) Ausbeute, (c) Produktivität. Versuchsbedingungen nach 4.4.8, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ °C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-5 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an separierter Rindergülle erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Gülle [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute $Y_{P/S}^P$ [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
Referenz	151	37	163	6	26	23
140	69	22	424	20	0	k.A.
150	70	22	424	20	0	k.A.
160	70	22	424	19	0	k.A.
180	70	22	424	15	0	k.A.
200	91	27	673	14	0	18
220	92	28	673	11	0	18
250	102	30	673	11	0	23
300	112	30	673	7	0	26
400	118	35	484	10	0	31
500	130	31	384	28	0	36
550	136	33	384	22	0	37
739	155	37	306	12	0	48

5.1.2.5 Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) als Substrat

Kartoffelrestfruchtwasser ist ein Rückstandsprodukt aus der Erzeugung von Kartoffelstärke. Es ist reich an Kohlenhydraten, Mineralstoffen und Proteinen und somit geeignet, um als Substrat für die Erythritherstellung in Frage zu kommen. Um die Auswirkung und Eignung von PNC als Cosubstrat zu untersuchen, wurden

Medien nach 4.4.7 hergestellt und die dort beschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten, als Referenz dient eine Kultur mit 15 g/L Hefeextrakt (MERCK) als Stickstoff- und Supplinquelle bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen. Hefeextrakt enthält einen größeren Anteil des Stickstoffs in Form von Nitrat (~1,4 g/kg PNC).

In mehreren Versuchsreihen wurde die optimale PNC-Konzentration für eine maximale Erythritproduktion identifiziert. Mit zunehmendem PNC-Gehalt nahmen sowohl die Ausbeute als auch Konzentration von Erythrit zu und erreichten zwischen 50 – 55 g/L ihr Maximum bei ebenfalls zunehmender Produktivität (Abbildung 5-5, Tabelle 5-6). Eine weitere Steigerung der PNC-Konzentration führte zu einer verminderten Erythritbildung und Ausbeute. Auffällig ist, dass über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich an PNC sich der Zeitpunkt der maximalen Erythritbildung immer weiter nach vorne verschiebt.

Die Glycerinbildung nimmt mit ansteigender PNC-Konzentration stetig ab und steigt nach dem Durchlaufen eines Minimalbereiches zwischen 50 – 60 g/L PNC wieder leicht an. Die Ethanolkonzentration wächst mit der Zunahme der PNC-Konzentration stetig an und erreicht bei 90 g/L den Maximalwert im untersuchten Konzentrationsbereich.

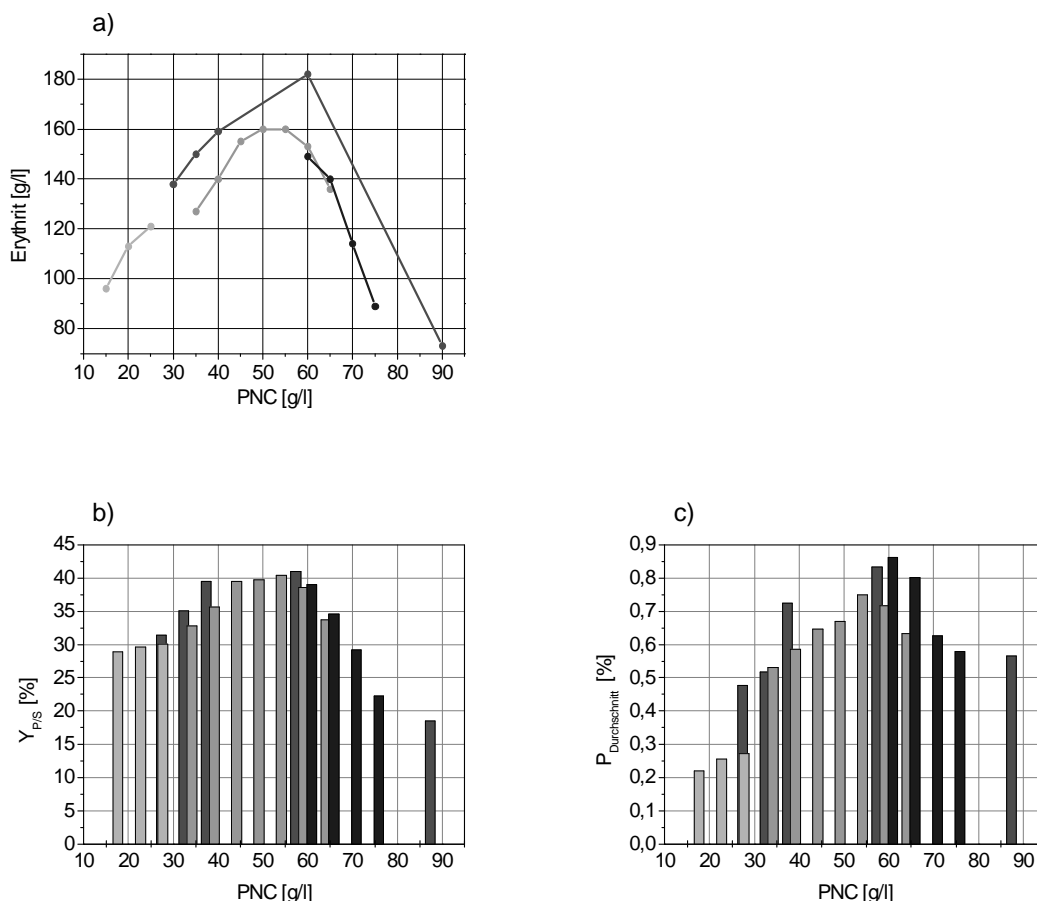


Abbildung 5-5 Auswirkungen unterschiedlicher Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrationen auf die Produktbildung. (a) Erythritkonzentration, (b) Ausbeute, (c) Produktivität. Versuchsbedingungen nach 4.4.7, pH nicht korrigiert, $T = 33^\circ\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-6 *In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.*

PNC [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
Referenz	159	40	213	0	8	30
15	96	24	433	30	0	17
20	112	29	433	40	0	23
25	121	31	407	32	0	28
35	127	33	238	23	0	38
40	140	36	238	15	0	35
45	155	40	238	7	0	41
50	160	40	238	1	0	36
55	160	40	213	2	9	35
60	153	39	213	1	10	35
65	136	34	213	0	24	29
70	113	29	165	3	40	k.A.
75	89	22	140	4	53	k.A.
80	92	22	140	4	53	k.A.
90	73	19	128	7	56	30

Mit einer maximalen Erythritbildung von 160 g/L und einem günstigen Nebenproduktspektrum sowie einem sehr niedrigen Preis eignet sich Kartoffelrestfruchtwasser zur technischen Herstellung von Erythrit (Abbildung 5-5, Tabelle 5-6). Das in den Schüttelkolben ermittelte Optimum von 55 g/L PNC wird für eine Fermentation herangezogen. Der Sauerstoffpartialdruck wird manuell auf einen Wert von 5 % eingestellt, was den Verhältnissen im Schüttelkolben gleicht (siehe 5.2.2.1). Der pH-Wert wurde nicht korrigiert. Es wurde einmal das Substrat Saccharose nachgefüttert.

Wie in der nachfolgenden Abbildung erkenntlich ist, wird eine Erythritendkonzentration von 199 g/L bei einer Ausbeute von 37,5 % und einer Produktivität von 0,82 g/Lh erreicht (Abbildung 5-6, Tabelle 5-7). Das Nebenproduktspektrum unterscheidet sich deutlich von den Ergebnissen im Schüttelkolben. Während der Fermentation werden Glycerinkonzentrationen von bis zu 49 g/L gebildet. Da die Abtrennung von Glycerin aus der Kulturbrühe schwierig ist und hohe Kosten verursacht, muss in künftigen Fermentationen eine möglichst niedrige Glycerinbildung angestrebt werden. Ethanol wird in nur sehr geringen Konzentrationen gemessen. Dies kann jedoch auch eine Folge des Ethanolaustrages mit dem Abgasstrom sein.

Zwar werden bei der Verwendung von Kartoffelrestfruchtwasser Erythritkonzentrationen von bis zu 199 g/L in der Fermentation bzw. 160 g/L im Schüttelkolben bei einer Kartoffelrestfruchtwasserkonzentration von 55 g/L erreicht, doch sind die Ausbeuten im Vergleich zum teilweisen Ersatz von Hefeextrakt durch Ammoniumchlorid (siehe 5.1.2.3) um 20 % niedriger.

Aus dem Verlauf der Erythritkonzentration geht zudem hervor, dass die Zufütterung des Substrats Saccharose zu spät erfolgte. Eine Zufütterung zum Zeitpunkt von 140 h hätte eine wesentlich bessere Produktivität durch die Vermeidung der stationären Phase ergeben.

Eine Untersuchung der Konzentrationsverläufe von Nitrat, Nitrit und Ammonium ergab, dass das vorhandene Ammonium und Nitrat schnell und vollständig aus dem Medium aufgenommen wird. Gleichzeitig ist ein starker Anstieg und Abfall der Nitritkonzentration zu beobachten. Es ist nicht ersichtlich, ob dieses Nitrit aus Ammonium oder Nitrat stammt. Zum Ende der Kultivierung hin ist ein leichter Anstieg der Nitratkonzentration zu verzeichnen. Der fast vollständige Abbau von Ammonium,

Nitrat und Nitrit ist für die spätere Aufarbeitung sehr günstig, da dadurch eine geringere Menge an Ionen durch Ionentauscher abgetrennt werden müssen. Das im Medium vorhandene Phosphat zeigt eine um 4 g/L schwankende Konzentration.

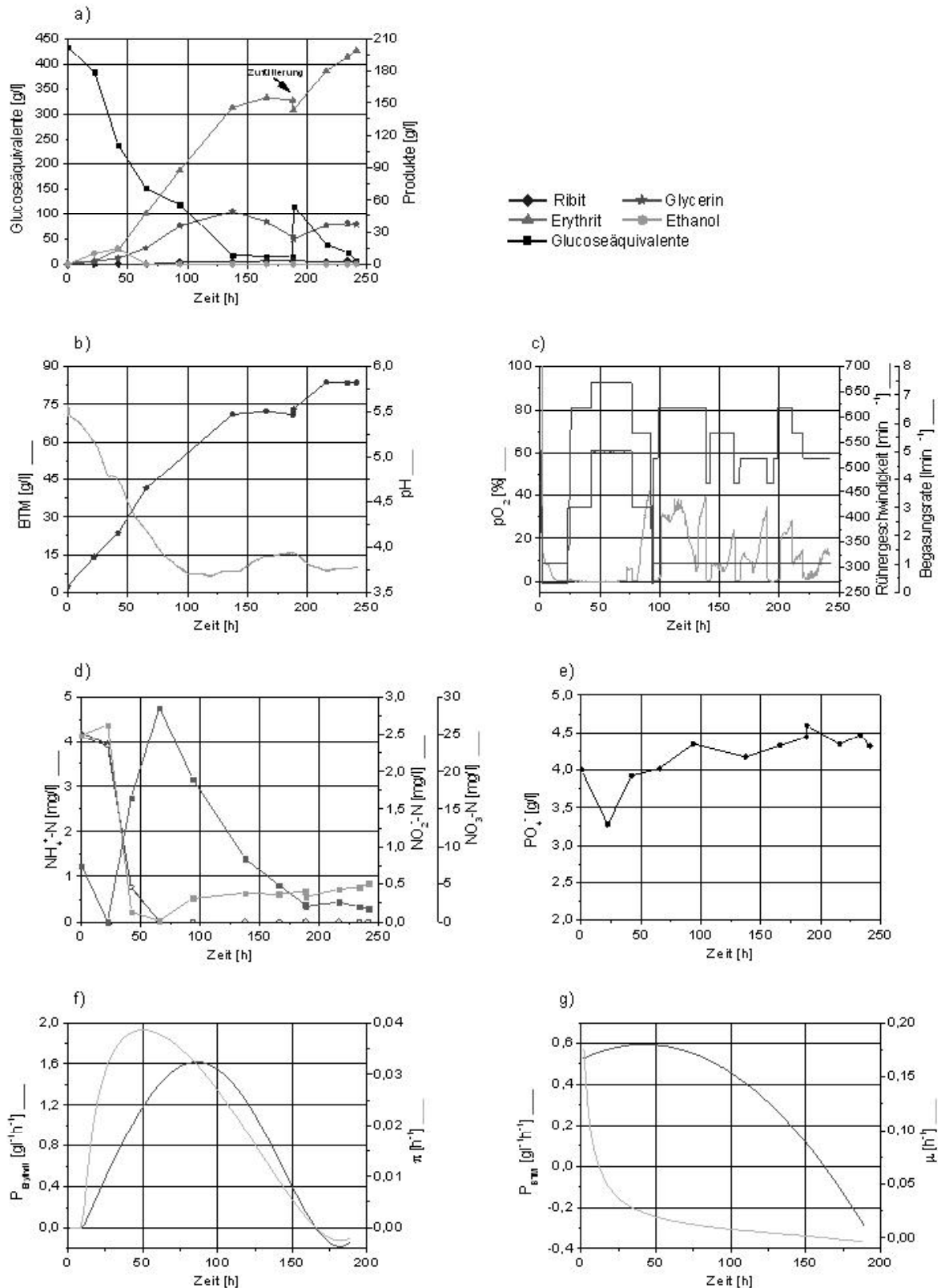


Abbildung 5-6 Fermentation mit PNC-Medium in der Satellitenfermentereinheit: Die Produktbildungs- und die Wachstumsparameter (e, g) sind nur bis zum Zeitpunkt der Zufütterung ermittelt. Versuchsbedingungen nach 4.4.7 (55 g/L), pH nicht korrigiert, T=33 °C, 120 UpM.

Tabelle 5-7 *In der Fermentation mit Kartoffelrestfruchtwasser erreichte Produktkonzentration und Ausbeute. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.*

PNC [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
55	199	38	241	38	0	83

5.1.3 Einfluss von Spurenelementen und Vitaminen

Viele Metallionen agieren als Cofaktoren oder als Hemmer für Enzyme in lebenden und ruhenden Zellen. Zudem dienen sie zur Stabilisierung von Proteinen, Enzymen oder Enzymkomplexen. Die Konzentration eines Metallions ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Alle Enzyme, die ein Metallion zur Stabilisierung oder als Cofaktor benötigen, können je nach untersuchtem Parameter (Ausbeute, Selektivität, Aktivität, Stabilität) unterschiedliche Optima aufweisen. Diese Optima können, müssen aber nicht zusammenliegen. Die Veränderung der Konzentration in einen optimalen Konzentrationsbereich für einen Parameter kann zur Verminderung eines anderen Parameters führen.

Für jeden Prozess ist es wichtig, in Erfahrung zu bringen, welches Metallion einen Einfluss welcher Art auf die Kultivierung hat. Bei der Verwendung von Substraten schwankender Qualitäten können verschiedentliche Konzentrationen an Metallionen vorliegen, die sich, einzeln oder im Zusammenspiel, unterschiedlich auf das Produktbildungsverhalten auswirken können. Die Kenntnis über den Einfluss einzelner Metallionen hilft daher bei der Einschätzung der Verwertung des Substrats und der zu erwartenden Produktbildung.

Eine Untersuchung der Auswirkungen von Metallionen auf eine Kultivierung wird als Ergebnis immer die Summe aller Auswirkungen auf den Stoffwechsel aufweisen, da der Einfluss auf die einzelnen Enzyme des gesamten Metabolismus nicht in einem einzelnen Experiment bestimmt werden kann. Grundsätzlich besteht zwar die Möglichkeit, das gesamte Proteom aufzureinigen und jeweils den Einfluss sämtlicher zu untersuchender Metallionen auf alle gewünschten Parameter zu untersuchen, jedoch ist diese Arbeit extrem langwierig und nur sehr schwer zu interpretieren. Die Auskunft aus einem Experiment, bei dem die ganze Zelle betrachtet wird, liefert das für den Experimentator am besten zu verwertende Ergebnis.

Pilze benötigen von einigen anorganischen Komponenten, die mit den Nährmedium angeboten werden müssen, sehr geringe Menge. Die wichtigsten dieser Spurenelemente sind Schwermetallionen. In der Regel genügen davon Konzentrationen in der Größenordnung Milligramm je Liter oder darunter, der Bedarf an Magnesium und Eisen ist jedoch meist etwas größer. Ein Unterangebot an Spurenelementen wirkt wachstums- oder aktivitätsbegrenzend. Hohe Konzentrationen der gleichen Stoffe sind oftmals hemmend. Relativ niedrig liegen die Schwellenwerte für Quecksilber und Kupfer (außerdem für nicht in Sulfationen oder Aminosäure gebundenen Schwefel), was in manchen Fungizidpräparaten ausgenutzt wird.

Metallionen kommen einerseits fest gebunden in den Metalloenzymen vor (z.B. Kupfer oder Zink in Metalloprotein-Enzymen ohne prosthetische Gruppen, Eisen in den Chelaten der Porphyrin- und Hämverbindungen, als Metallflavin Gruppierungen in Oxidasen und Dehydrogenase), andererseits dienen Metallionen als Aktivatoren

verschiedener enzymatischer Umsetzungen, beispielsweise Magnesium in der Glykolyse, Mangan bei verschiedenen Reaktionen des Citronensäurezyklus, und Chlorid fördert die Aktivität von α -Amylasen.

Vitamine sind durch ihre Bedeutung in der Humanphysiologie charakterisiert. Sie können durch den menschlichen Körper nicht synthetisiert werden, sondern müssen über die Nahrung aufgenommen werden. Ihr Fehlen ruft physiologische Störungen hervor. Vitamine sind Coenzyme, Teile oder Vorstufen von Coenzymen. So wie in den Pilzprotoplasten grundsätzlich die gleichen Reaktion ablaufen wie beispielsweise in Säugetierzellen, kommen den Vitaminen auf molekularer Ebene in der Regel die gleichen Funktionen wie im Stoffwechsel der höheren Organismen zu. Wegen dieser generellen Bedeutung nimmt man an, dass alle Vitamine von nahezu jeder Zelle benötigt werden, und, sofern sich eine Zufuhr von außen als unnötig erweist, muss die betreffende Zelle die Synthesen selbst besorgen (Prototrophie). Meist sind diese Organismen nur für einzelne Vitamine auxotroph. Keine Bedeutung für die Pilze haben offenbar die fettlöslichen Vitamine. Das gleiche gilt für Vitamin C, das von Pilzen durch verschiedenartige reduzierende Verbindungen ersetzt werden kann.

5.1.3.1 Cu^{2+}

Kupfer zählt zu den bei Hefen am besten untersuchten Übergangsmetallen. Die Ansammlung von Kupfer kann zur Bildung von Hydroxylradikalen in der Zelle führen, die Proteine oxidieren, DNS und RNS spalten sowie Membranen durch die Peroxidation von Lipiden zerstören können. Für die Zelle ist es daher wichtig, den intrazellulären Kupferspiegel kontrollieren zu können und sich bei erhöhter Kupferkonzentration die Möglichkeit einer Entgiftung zu haben.

Kupfer spielt somit einerseits eine Rolle als Cofaktor und Stabilisator in der Zelle, andererseits sind die Auswirkungen eines zu hohen Kupfergehalts im Medium und damit in der Zelle nachteilig für sie.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Kupferionen wurden dem Medium Kupferionen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Kupfer betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.16 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Betrachtet man den Verlauf der Erythritkonzentration in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration, so stellt man fest, dass die Produktkonzentration zunächst ansteigt, um bei 5 mg/L Cu^{2+} das Maximum zu erreichen und danach bis 50 mg/L Cu^{2+} auf annähernd einem Niveau zu stagnieren (Abbildung 5-7, Tabelle 5-8). Eine weitere Zunahme der Kupferkonzentration führt zu einem Absinken der Produktkonzentration.

Das Maximum der Ausbeute ist stärker ausgeprägt, folgt aber in allen wesentlichen Punkten dem prinzipiellen Verlauf des Produktes Erythrit.

Die Bildung von Ethanol wird bereits durch 1 mg/L Cu^{2+} unterdrückt; erst eine Erhöhung der Cu^{2+} -Konzentration auf 100 mg/L lässt wieder die Bildung von Ethanol zu.

Glycerin wird durch die Gegenwart von Kupferionen im Medium verstärkt gebildet und zeigt ein Maximum bei einer Kupferkonzentration von 5 mg/L, um im weiteren Verlauf auf einem Niveau überhalb des Glycerinpegels der Vergleichskultur zu bleiben.

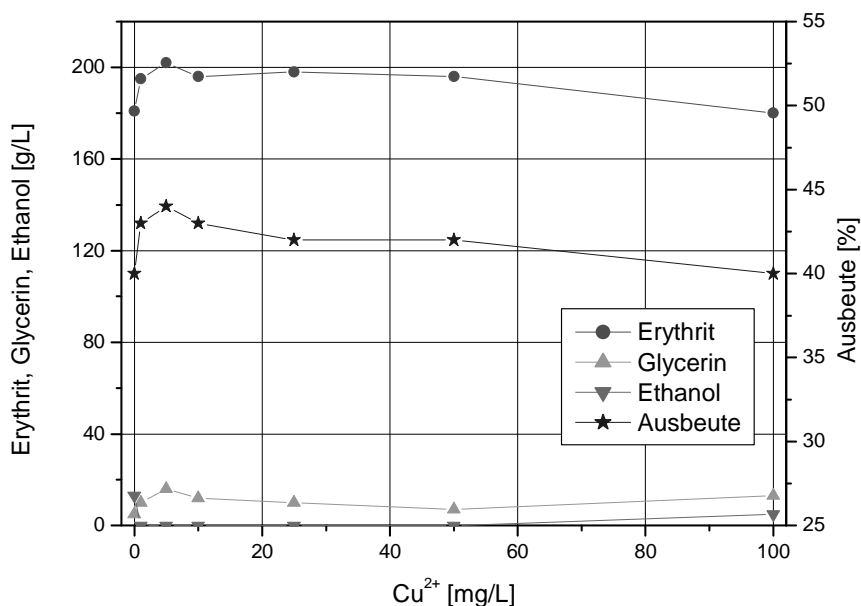


Abbildung 5-7 Einfluss der Cu^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-8 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Cu^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Cu^{2+} [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^{P}_{s} [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	181	40	240	5	13	60
1	195	43	240	10	0	58
5	202	44	216	16	0	33
10	196	43	240	12	0	56
25	198	42	240	10	0	54
50	196	42	240	7	0	65
100	180	40	216	13	5	38

5.1.3.2 Mg^{2+}

Magnesium wirkt sich aktivierend auf die Phosphorylierungsvorgänge des Citronensäurezyklus und des Pentosephosphatzyklus aus und ist an allen durch ATP katalysierten Vorgängen beteiligt [2].

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Magnesiumionen wurden dem Medium Magnesiumionen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Magnesiumionen betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.16 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Ansätze stellt man deutliche Unterschiede in den einzelnen Kulturverläufen fest. In Gegenwart von 1 mg/L Mg^{2+} ist eine geringe Steigerung der Ausbeute und der Erythritkonzentration zu beobachten, zugleich wird weniger Glycerin gebildet (Abbildung 5-8, Tabelle 5-9). Eine weitere Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration führt zu einem drastischen Rückgang in Ausbeute und Konzentration des Hauptproduktes. Nach dem Durchschreiten des Minimums bei 10 mg/L Mg^{2+} nehmen Ausbeute und Konzentration an Erythrit wieder zu, wobei jedoch nur die Ausbeute das anfängliche Niveau erreicht.

Die Gegenwart von Mg^{2+} im Konzentrationsbereich 1 – 50 mg/L hat keinen Einfluss auf die Ethanolbildung. An den Randbereichen der getesteten Konzentrationsspanne ist eine geringe Ethanolbildung zu beobachten. Die Glycerinbildung bleibt ab einer Mg^{2+} -Konzentration von 5 mg/L auf dem gleichen Niveau von ca. 18 g/L.

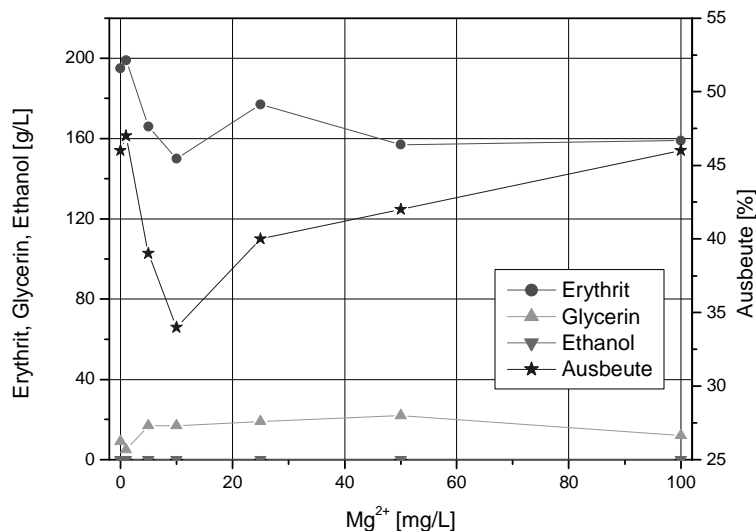


Abbildung 5-8 Auswirkung der Mg^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-9 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Mg^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Mg^{2+} [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	195	46	240	9	0	77
1	199	47	240	5	0	72
5	166	39	240	17	0	87
10	150	34	189	17	0	86
25	177	40	240	19	0	90
50	157	42	217	22	0	81
100	159	46	240	12	0	93

5.1.3.3 Mn^{2+}

Mangan tritt als Spurenelement in allen lebenden Zellen auf und ist dort von großer Bedeutung. Es ist beteiligt an der Atmungskettenphosphorylierung und an zahlreichen Oxidoreduktasenreaktionen beteiligt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Manganionen wurden dem Medium Manganionen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Zugabe von Manganionen betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.16 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

In allen Ansätzen mit zusätzlichem Mn^{2+} ist die Ausbeute und die Endkonzentration an Erythrit höher als in der Vergleichskultur ohne Mn^{2+} -Zusatz und liegt im Bereich um 205 g/L. Schon die Gegenwart von 1 mg/L reicht aus, um eine Ethanolbildung

effektiv zu unterdrücken. Die Glycerinbildung sinkt zunächst ab, um bei Erreichen einer Mn^{2+} -Konzentration von 25 mg/L wieder anzusteigen (Abbildung 5-9, Tabelle 5-10).

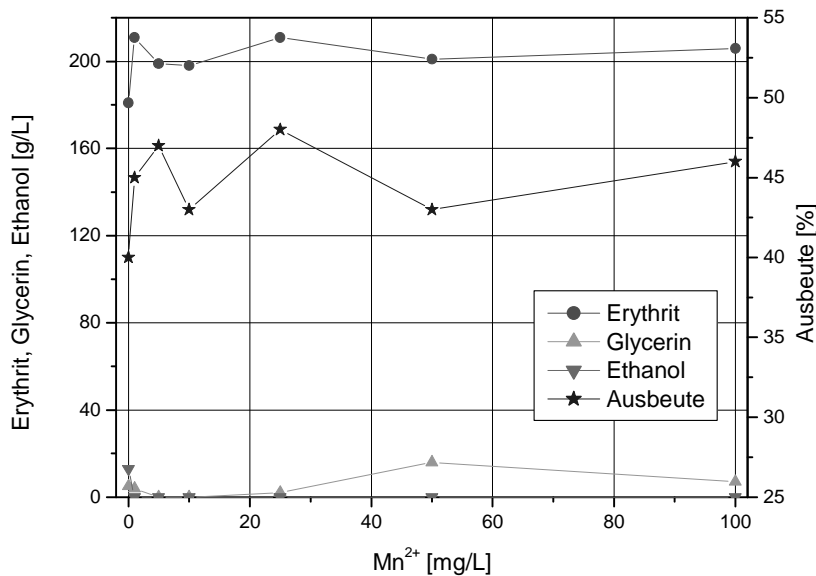


Abbildung 5-9 Auswirkung der Mn^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-10 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Mn^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Mn^{2+} [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	181	40	240	5	13	60
1	211	45	240	4	0	70
5	199	47	240	0	0	74
10	198	43	240	0	0	72
25	211	48	240	2	0	73
50	201	43	192	16	0	36
100	206	46	215	7	0	37

5.1.3.4 Fe^{3+}

Eisenionen können dem Kulturmedium entweder durch Rohsubstrate zugefügt werden oder an korrodierten Bauteilen innerhalb einer Produktionsanlage in das Medium gelangen.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Eisenionen wurden dem Medium Eisenionen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Eisenionen betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.16 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Auffällig ist die konstante Verschlechterung des Fermentationsergebnisses mit zunehmender Fe^{3+} -Konzentration (Abbildung 5-10, Tabelle 5-11). Sowohl Ausbeute als auch Endkonzentration des Hauptproduktes sinken. Die Bildung von Glycerin wird durch die Beimischung von Fe^{3+} positiv beeinflusst. Fe^{3+} bis zu einer Konzentration von 100 mg/L hat keine Auswirkungen auf die Bildung von Ethanol.

Die bei einer Fe^{3+} -Konzentration von 25 mg/L auftretende erhöhte Bildung und Ausbeute von Erythrit ist ein meßtechnischer Ausreißer. Da bereits geringe Mengen an Fe^{3+} die Erythritbildung empfindlich stören, muss in einer Produktionsanlage unbedingt der Einbau von nichtkorrosionsbeständigen Stählen vermieden werden. Zudem ist die Untersuchung der Substrate auf ihren Eisengehalt notwendig.

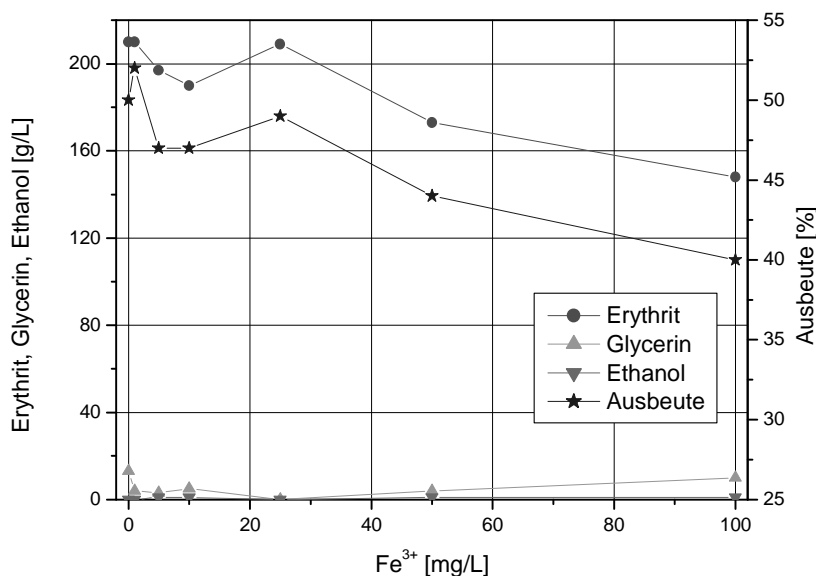


Abbildung 5-10 Auswirkung der Fe^{3+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, $T = 33^\circ\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-11 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Fe^{3+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Fe^{3+} [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	210	50	239	13	0	33
1	210	52	215	4	0	21
5	197	47	215	3	1	22
10	190	47	215	5	1	21
25	209	49	215	0	0	25
50	173	44	215	4	1	15
100	148	40	215	10	1	15

5.1.3.5 Ca^{2+}

Calcium ist ein häufig in lebenden Organismen in großen Mengen vorkommendes Erdalkalimetall. Wird bei einem Verfahren mit Kalkmilch der pH-Wert korrigiert oder kommen Calcium-Alginat-Immobilisate zum Einsatz, so ist die Calciumkonzentration im Medium zwangsläufig erhöht.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Calciumionen wurden dem Medium Calciumionen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Calciumionen betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.16 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration sinkt die Erythritbildung nach anfänglicher leichter Erhöhung auf einen Wert von 140 g/L ab, um danach langsam wieder anzusteigen. Die Ausbeute sinkt schon bei ab 1 mg/L Ca^{2+} stark ab, um bei zunehmender Konzentration langsam anzusteigen. Die enorm hohe Ausbeute bei 25 mg/L stellt einen Ausreißer dar (Abbildung 5-11, Tabelle 5-12).

Die Auswirkung von Ca^{2+} im untersuchten Konzentrationsbereich auf die Glycerinbildung ergibt ein Maximum bei 1 mg/L Ca^{2+} , welches somit mit dem anfänglichen Maximum der Erythritkonzentration zusammenfällt. Eine weiter zunehmende Ca^{2+} -Konzentration hat nur eine geringe Auswirkung auf die Glycerinbildung.

Die Ethanolbildung wird durch die Gegenwart von Ca^{2+} bis zu Konzentrationen von 100 mg/L nicht beeinträchtigt.

Dieser Gesamtverlauf ist im Hinblick auf einen möglichen Immobilisierungsschritt sehr vorteilhaft, da größere Mengen an Ca^{2+} den Kultivierungsprozess vorteilhaft beeinflussen.

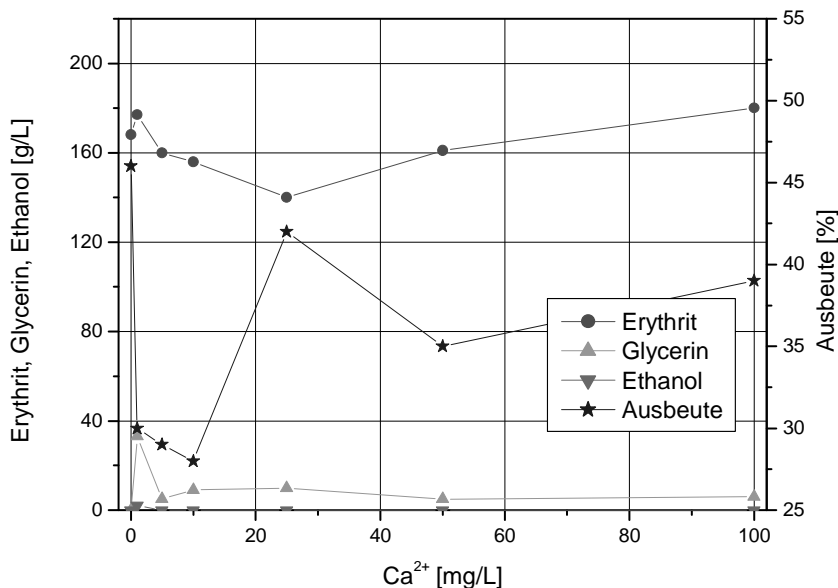


Abbildung 5-11 Auswirkung der Ca^{2+} -Konzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-12 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ca^{2+} erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Ca^{2+} [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^{P}_{S} [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	168	46	167	0	0	20
1	177	30	167	33	2	19
5	160	29	167	5	0	16
10	156	28	167	9	0	15
25	140	42	167	10	0	15
50	161	35	167	5	0	17
100	180	39	191	6	0	21

5.1.4 Vitamin B₁

Wie aus der Literatur bekannt ist, kann sich die Beimengung von Vitamin B₁ zum Medium vorteilhaft auf die Erythritbildung auswirken [175;179;172].

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Vitamin B₁ wurden dem Medium Vitamin B₁ in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Vitamin B₁ betrachtet, das Medium nach 4.4.17 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Vergleicht man die Verläufe der Erythritkonzentration und der Ausbeute, so stellt man fest, dass die Erythritkonzentration über den gesamten untersuchten Vitamin B₁-Bereich sich nur wenig verändert. Demgegenüber steht die große Auswirkung von Vitamin B₁ auf die Ausbeute, die nach einem Maximum bei 1 mg/L einen Tiefpunkt bei 10 mg/L erreicht und im folgenden langsam wieder zunimmt, ohne jedoch das Anfangsniveau zu erreichen. Die Optima für Ausbeute und Erythritkonzentration liegen dicht beisammen (Abbildung 5-12, Tabelle 5-13).

Glycerin wird bis zu einem Vitamin B₁-Gehalt von 50 mg/L mit zunehmender Konzentration gebildet, um danach wieder abzunehmen. Der Glyceringehalt zum Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration sinkt in allen Ansätzen mit Vitamin B₁ jedoch nie unter den Referenzwert.

Ein Einfluss auf die Ethanolbildung ist nur bedingt zu beobachten, sie bleibt bei allen Versuchsansätzen über einem Niveau von 53 g/L.

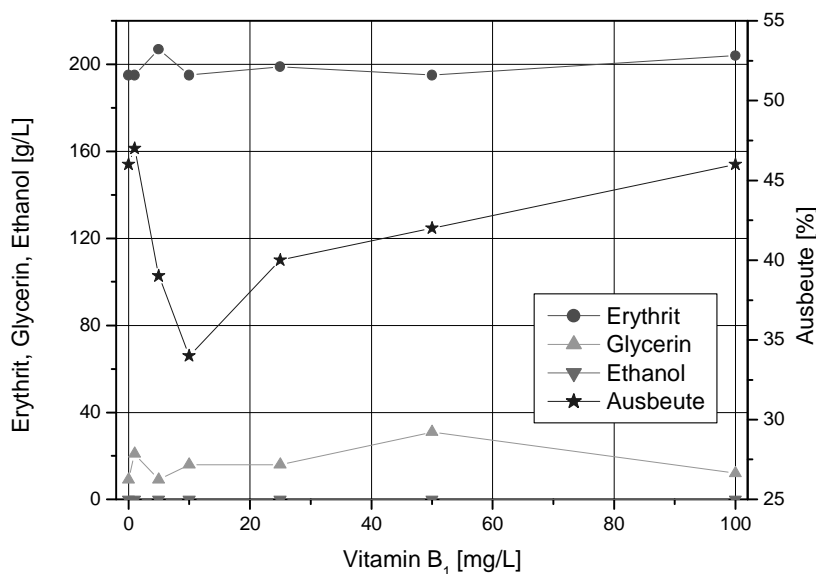


Abbildung 5-12 Auswirkung der Vitamin B₁-Konzentration auf die Produktbildung.
Versuchsbedingungen nach 4.4.16, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.

Tabelle 5-13 *In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ribit (4.4.4) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.*

Vitamin B1 [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	195	46	240	9	0	77
1	195	49	189	21	0	53
5	207	49	240	9	0	76
10	195	45	240	16	0	70
25	199	45	240	16	0	70
50	195	46	189	31	0	56
100	204	42	240	12	0	68

5.1.5 Einfluss der Schwefelquellen

Schwefel gehört neben Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Phosphor zu den wichtigsten Elementen in der Biochemie. Er tritt in Zellen sehr häufig in den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin auf. Sein Anteil an der Zellmasse beträgt etwa 1 % (w/w) [154].

Es soll festgestellt werden, ob durch die zusätzliche Gabe von Schwefel in Form von Cystein oder Sulfat eine Erhöhung der Erythritkonzentration oder der Ausbeute erreicht werden kann.

Die für diese Versuche verwendeten Kulturen wiesen eine Tieftemperaturschädigung auf. Vergleichstests haben jedoch ergeben, dass die Ergebnisse auf unbeschädigte Stämme übertragbar sind (Daten hier nicht gezeigt).

5.1.5.1 Einfluss der Cysteinkonzentration

Um den Einfluss zusätzlich dem Medium zugesetztem Schwefel in Form von Cystein zu untersuchen, wurden Medien nach 4.4.14 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Cystein steht in Form einer freien Aminosäure direkt zum Einbau in Proteine zur Verfügung. Den Mikroorganismen steht jedoch die Möglichkeit offen, das Cystein zuerst zu Sulfid oder elementarem Schwefel umzuwandeln und dann in andere Verbindungen einzufügen [154].

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen auf, dass bereits geringe Mengen an Cystein die Erythritbildung und Ausbeute schmälern. Das Nebenproduktspektrum wird durch die Gegenwart von Cystein nur wenig beeinflusst (Abbildung 5-13, Tabelle 5-14).

Cystein ist nicht geeignet, um als fördernder Zusatz in einer technischen Herstellung von Erythrit verwandt zu werden. Auf weitere Untersuchungen mit Cystein wird verzichtet.

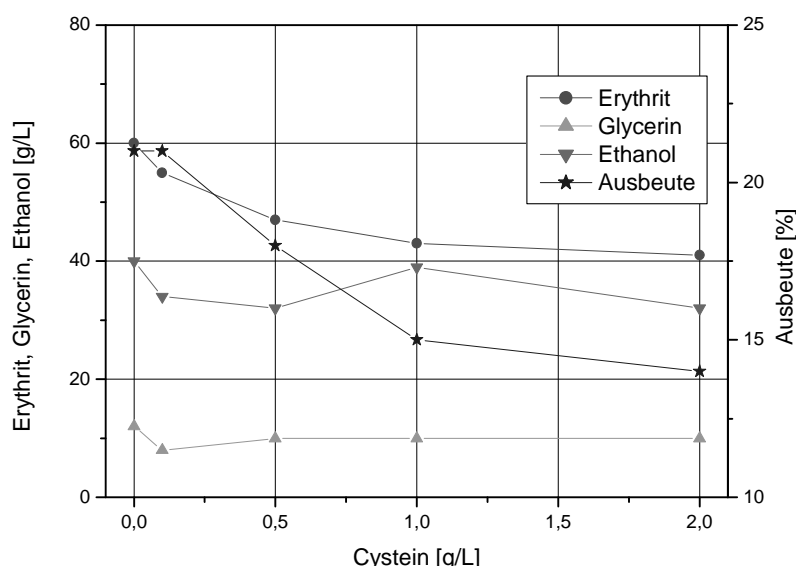


Abbildung 5-13 Einfluss der Cysteinkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.14, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-14 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Cystein erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Cystein [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	60	21	104	12	40	20
0,1	55	21	72	8	34	18
0,5	47	18	72	10	32	17
1	43	15	72	10	39	17
2	41	14	72	10	32	17

5.1.5.2 Einfluss der Sulfatkonzentration

Sulfat tritt in der Natur häufig in Form von Mineralsalzen auf und stellt eine gnige Schwefelquelle für viele Mikroorganismen dar. Durch assimilatorische Sulfatreduktion kann Sulfat direkt in Sulfid reduziert und organisch gebunden werden. Damit steht es dem Organismus zur Verfügung [154].

Zur Untersuchung der Verwertbarkeit von Sulfat und des Einflusses auf die Erythritbildung und Ausbeute sowie das Nebenproduktspektrum wurden Medien nach 4.4.15 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Die Zugabe von Sulfat zum Medium zeigt keine positive Auswirkung auf die Erythritbildung und Ausbeute auf. Das Nebenproduktspektrum ist ebenfalls sehr ähnlich, lediglich eine leichte Abnahme der Ethanolkonzentration ist festzustellen (Abbildung 5-14, Tabelle 5-15). Gleichsam ist eine Abnahme der Biomassebildung festzustellen.

Da die Gabe von Sulfat zusätzlich zum Medium keine positiven Effekte hervorruft, ist die Verwendung von Sulfat für die technische Herstellung von Erythrit nicht erforderlich.

Eine in der Kultivierung durch Schwefelmangel hervorgerufene Limitierung kann ausgeschlossen werden, da weder die Gabe von Cystein noch die Gabe von Sulfat einen förderlichen Effekt haben. Bei der Wahl der Stickstoffquelle sollte darauf geachtet werden, dass die vorhandene Menge an Sulfat möglichst niedrig ist.

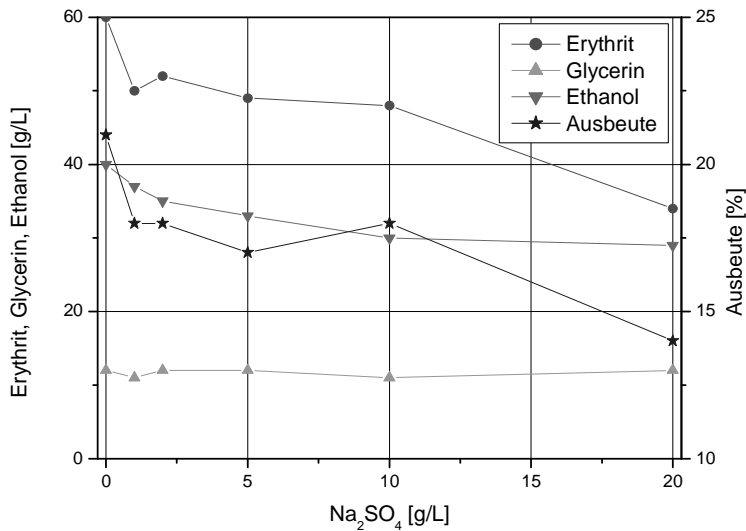


Abbildung 5-14 Auswirkung der Sulfatkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.15, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-15 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumsulfat erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Na ₂ SO ₄ [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	60	21	104	12	40	20
1	50	18	104	11	37	15
2	52	18	104	12	35	15
5	49	17	104	12	33	14
10	48	18	104	11	30	14
20	34	14	104	12	29	12

5.1.6 Einfluss der Phosphatkonzentration

Um eine mögliche Phosphatlimitierung zu untersuchen, wurden dem Produktionsmedium verschiedenen Mengen an Phosphat zugesetzt. Viele Mikroorganismen werden durch eine zu geringe Phosphatkonzentration im Wachstum limitiert, was Auswirkungen auf die Metabolitbildung in der Zelle haben könnte. Da in diesem Prozess eine wachstumsassoziierte Produktbildung vermutet wird, wäre eine Phosphatlimitierung auch eine Produktlimitierung. Zur Untersuchung des Einflusses wird ein Medium nach 4.4.13 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Der Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Erythritkonzentration ist nur sehr gering und beträgt maximal 7 g/L Erythrit. Die Ausbeute ist bis zu einer KH_2PO_4 -Konzentration von 10 g/L konstant und sinkt bei einer weiteren Zunahme ab (Abbildung 5-15, Tabelle 5-16).

Ab einer KH_2PO_4 -Konzentration von 5 g/L ist eine geringe Verminderung der Glycerinbildung zu beobachten. Das in den Schüttelkolben zum Zeitpunkt der Beendigung der Fermentation vorhandene Ethanol ist erst bei Konzentrationen von über 5 g/L KH_2PO_4 zu beobachten.

Für eine weitere Kultivierung wird eine Phosphatlimitierung nicht erwartet, da durch die Beifügung von Phosphat keine positive Auswirkung auf die Produktbildung erreicht wird.

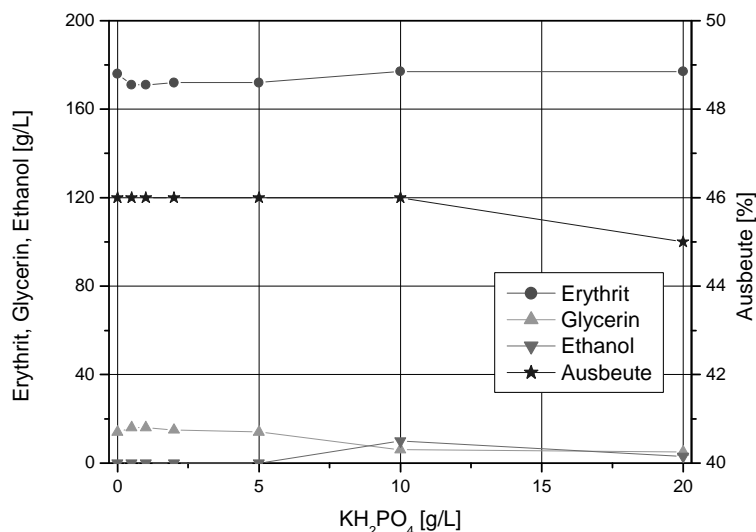


Abbildung 5-15 Einfluss der Kaliumdihydrogenphosphatkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.13, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^\circ\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-16 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an KH_2PO_4 erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

KH_2PO_4 [mg/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	176	46	209	14	0	28
0,5	171	46	209	16	0	28
1	171	46	209	16	0	29
2	172	46	209	15	0	27
5	172	46	209	14	0	28
10	177	46	209	6	10	22
20	177	45	234	5	3	28

5.1.7 Einfluss von Metaboliten und Substrat

Die während der Fermentation des Pilzes SZ 101 entstehenden Produkte Erythrit, Ethanol, Ribit und Glycerin beeinflussen über verschiedene Schnittstellen des Metabolismus die Herstellung von Erythrit (siehe 3.4.2). Die entstehenden Nebenprodukte können sich entsprechend hemmend oder fördernd auswirken, bzw. die Selektivität der Erythritbildung beeinflussen.

5.1.7.1 Erythrit

Zur Auslegung eines Prozesses ist die Kenntnis über das Produktbildungsverhalten sowie über die gekoppelte Substrat-Produktthemmung wichtig. Diese Daten können durch die Durchführung von unterschiedlichen Ansätzen mit verschiedenen Substrat-Produkt-Konzentrationen ermittelt werden. Sie geben Anhaltspunkte, an welchen Stellen der Kultivierung ein Zufüttern des Substrates sinnvoll ist und auf welchem Wege die maximale Ausbeute und Produktkonzentration erreicht werden können. Zur Untersuchung der Auswirkungen von Erythrit und Saccharose wurde dem Medium Erythrit und Saccharose in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.10 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Die Medien sind kombinierte

Ansätze der Saccharosekonzentrationen und der Erythritkonzentrationen, so dass sich insgesamt 16 verschiedene Kombinationen ergaben.

Betrachtet man die Versuchsreihen (Abbildung 5-16, Tabelle 5-17) mit 400 g/L Saccharose, so fällt auf, dass mit zunehmender Erythritkonzentration die Menge des gebildeten Erythrits und die Ausbeute abnimmt. Diese Versuchsreihe spiegelt eine sehr frühe Nachfütterung in der Kulturführung wider, so dass das Substrat immer im Bereich der Anfangskonzentration gehalten wird. Da SZ 101 eine osmophile Hefe ist, ist sie zu einem gewissen Maß tolerant gegenüber hohen osmotischen Drücken. Bei sehr hohen Konzentrationen an Erythrit nimmt zum einen der osmotische Druck so weit zu, dass es für die Zelle immer schwieriger wird, ihren Zellinnendruck gegen das Medium aufrecht zu erhalten und zum anderen nähert sich die Zelle dem Bereich der maximal tolerierten Erythritkonzentration. Eine Extrapolation der erhaltenen Werte liefert eine maximale Erythritkonzentration um 310 g/L. Die Löslichkeitsgrenze von Erythrit liegt bei 33 °C ca. bei 340 g/L. Bedingt durch den hohen osmotischen Druck weisen Kultivierungen mit 400 g/L Saccharose ein für die Aufreinigung ungünstiges Nebenproduktspektrum auf. Insbesondere die Bildung von Glycerin nimmt sehr stark zu.

Kulturansätze mit 200 g/L Erythrit weisen absolut geringere Mengen an gebildetem Erythrit bei höheren Ausbeuten als Kulturen mit 400 g/L Saccharose auf (Abbildung 5-16, Tabelle 5-17). Zudem ist die Bildung der Nebenprodukte deutlich günstiger als bei der doppelten Substratkonzentration. Dies wirkt sich günstig auf die Aufreinigung aus. Die Kultur mit der niedrigsten Erythritkonzentration weist neben der höchsten Erythritkonzentration und Ausbeute zudem keine Nebenproduktbildung und die höchste Produktbildungsrate auf.

Der Substratbereich von 100 g/L Saccharose zeigt eine mit zunehmender Erythritkonzentration zunehmende Erythritbildung und Ausbeute (Abbildung 5-16, Tabelle 5-17). Zudem werden keine Nebenprodukte gebildet. Da SZ 101 ein osmophiler Pilz ist, benötigt er bestimmte osmotische Drücke, um Substrat bilden zu können (siehe auch 3.4.2.2).

Ähnlich wie bei 100 g/L Saccharose verhalten sich die Ergebnisse mit 50 g/L Saccharose. Hier ist als Ausnahme jedoch die deutlich erhöhte Erythritbildung und Ausbeute bei 200 g/L Erythrit zu erkennen. Bei diesem Wert könnte es sich jedoch auch um einen Ausreißer handeln. Die Bildung der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol unterblieb ebenso gänzlich.

Die untersuchten Kombinationen von 50 g/L und 100 g/L Saccharose mit verschiedenen Erythritkonzentrationen weisen sehr hohe Ausbeuten auf, die über das theoretische Maximum zum Teil weit hinaus reichen. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass die Zellen in der Vorkultur bereits Erythrit gebildet und gespeichert und Substrate aufgenommen haben. Nach der Überimpfung nimmt der Pilz, wenn nur wenig Saccharose als Substrat vorhanden ist, dieses rasch auf und wandelt es in Glucose und Fructose um. Das Substrat ist damit scheinbar vollständig verbraucht. Fructose wird intrazellulär nur als Sekundärsubstrat verwandt und reichert sich somit im Zytoplasma an. Solange noch Glucose im Medium vorhanden ist oder sich die Zelle durch die Spaltung von Saccharose herstellen kann, ist die Verwertung von Fructose gehemmt (siehe auch 5.1.1.2). Die Hefe könnte nun versuchen, sich der Fructose zu entledigen und schüttet diese zusammen mit Glucose und Erythrit in das Medium aus. Der Erythritgehalt im Medium steigt schnell an. Im Verlauf der Kulturen deckt sich der plötzliche Anstieg der Erythritkonzentration mit einem mehr oder weniger ausgeprägten Plateau in der Glucoseäquivalentkurve. Die jetzt stattfindende Aufnahme von Glucose ist zwar energetisch ungünstig aber selektiv. Nachdem die Glucose im Medium verbraucht ist, wird auch die Fructose

aufgenommen und verwertet. Die über die dem theoretischen Maximum liegende Ausbeute ist daher nur scheinbarer Natur.

Eine geeignete Kulturführungsstrategie würde in Hinsicht auf Ausbeute und Produktendkonzentration eine Kultivierung mit einem anfänglichen Substratgehalt von 300 – 400 g/L und einer Zufütterung bei einem Substratgehalt von 50 – 100 g/L annehmen. Hierdurch wären Kosteneinsparungen bei sowohl Substrat als auch auf der Aufarbeitungsseite durch ein günstigeres Nebenproduktspektrum zu erwarten.

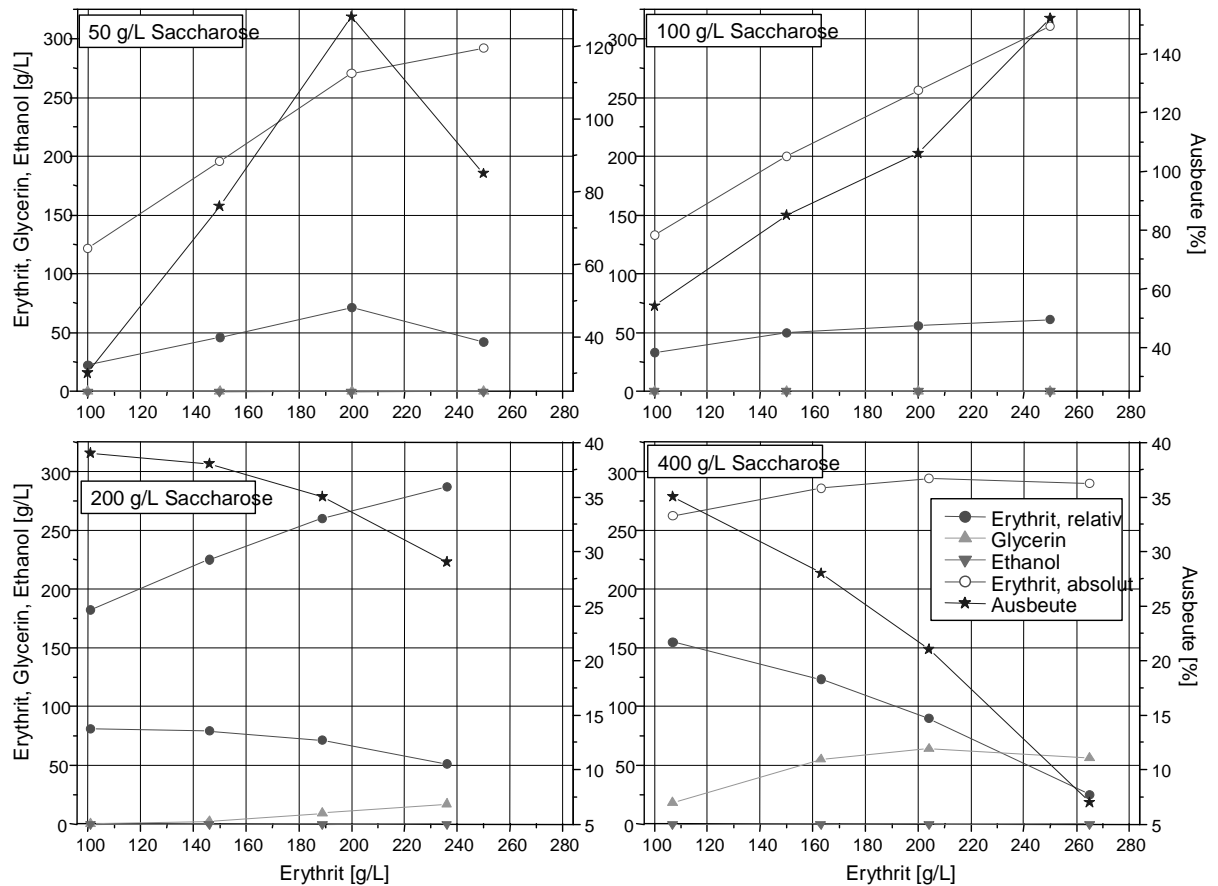


Abbildung 5-16 Auswirkung der Erythrit- und Saccharosekonzentration auf das Produktbildungsverhalten. Versuchsbedingungen nach 4.4.10, pH nicht korrigiert, T= 33 °C, 120 UpM.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5-17 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Erythrit erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die gebildete Erythritkonzentration und die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Gebildetes Erythrit bezeichnet das zusätzlich zum bereits im Medium enthaltene gebildete Erythrit. Zur Berechnung der absoluten Erythritkonzentration ist dieser Wert zur Konzentration des vorgelegten Erythrits zu addieren.

Saccharose [g/L]	Erythrit [g/L]	Gebildetes Erythrit [g/L]	Ausbeute $Y^{P/s}$ [% (w/w)]	Zeit [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
50	100	22	30	29	0	0	18
	150	46	76	24	0	0	16
	200	71	128	24	0	0	14
	250	42	85	24	0	0	13
100	100	33	51	29	0	0	17
	150	50	85	29	0	0	16
	200	56	106	29	0	0	15
	250	61	152	29	0	0	14
200	101	81	39	188	0	0	30
	146	79	38	214	2	0	28
	489	71	35	214	9	0	26
	236	51	29	214	17	0	24
400	107	155	35	314	18	0	28
	163	123	28	314	55	0	26
	204	90	21	314	64	0	22
	265	25	7	314	56	0	18

Die Ergebnisse wurden in einer fed-batch Schüttelkultur überprüft. Hierfür wurde ein Medium nach 4.4.1 hergestellt und bei Erreichen eines Substratniveaus unter 50 g/L Saccharose diese manuell in kristalliner Form nachgefüttert.

Wie aus der Verlaufsgrafik (Abbildung 5-17, Tabelle 5-18) zu erkennen ist, konnte eine Produktkonzentration von knapp 250 g/L erreicht werden. Die Gesamtausbeute betrug 41 %. Die Bildung der Nebenprodukte konnte ebenfalls auf einem geringen Niveau gehalten werden. Es ist anzufügen, dass zum Zeitpunkt des Abbrechens der Kultivierung immer noch Produkt gebildet wurde. Eine weitere Zufütterung von Substrat hätte zu einer zusätzlichen Erythritbildung geführt.

Die Ergebnisse aus den obigen Schüttelkolbenversuchen konnten bestätigt werden. Die Durchführung eines fed-batch Verfahrens zur Erhöhung der Erythritkonzentration ist möglich und führt zu hohen Produktendkonzentrationen. Die Aufarbeitung wird durch hohe Erythritkonzentrationen begünstigt. Eine Erythritkonzentration von 246 g/L ist die höchste in die Arbeit gebildete Erythritmenge.

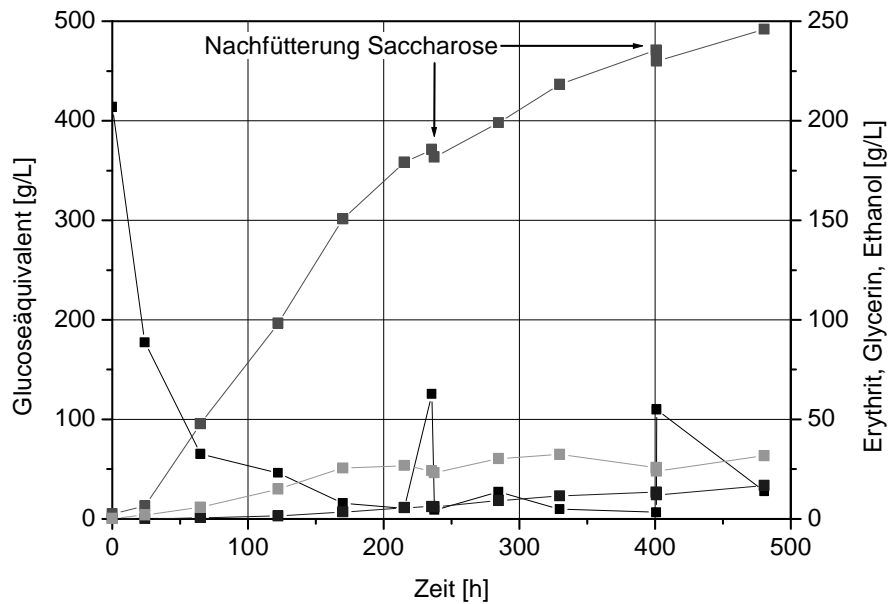


Abbildung 5-17 Schüttelkolben im fed-batch Verfahren. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ °C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-18 In der Kultivierung im fed-batch erreichte Produktkonzentration und Ausbeute. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]
246	41	480	32	0

5.1.7.2 Ethanol

Die Gegenwart von Ethanol wird von wenigen Mikroorganismen in höheren Konzentrationen toleriert und hat einen hemmenden Effekt auf deren Wachstum. Die anaerobe Bildung von Ethanol durch Gärung ist bei Hefen bekannt und weit verbreitet. Es kann bei aeroben Verhältnissen durch Hefen jedoch auch zur Energiegewinnung verwandt werden.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Ethanol wurden dem Medium Ethanol in fünf unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Ethanol betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.11 hergestellt und die dort angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten.

Die Erythritbildung und Ausbeute nimmt überraschender Weise mit zunehmender Ethanolkonzentration leicht zu und erreicht bei 20 g/L Ethanol ihr Maximum (Abbildung 5-18, Tabelle 5-19). Gleichfalls nimmt bis zu dieser Ethanolkonzentration auch die Glycerinbildung bis auf 0 g/L ab. Eine Steigerung der Ethanolkonzentration über 20 g/L hinaus führte zu drastischen Einbußen in Konzentration und Ausbeute von Erythrit. Ab Konzentrationen von mindestens 60 g/L ist kein Wachstum mehr zu beobachten. Ab dieser Konzentration wirkt Ethanol toxisch auf SZ 101. In manchen Kultivierungen wurden jedoch gebildete Ethanolkonzentrationen von bis zu 75 g/L beobachtet.

Mit Hilfe eines Ethanolensors auf Basis von Silikonmembranen ließe sich ein konstanter Ethanolpegel von 20 g/L einstellen und damit die Ausbeute und Endkonzentration an Erythrit gezielt erhöhen.

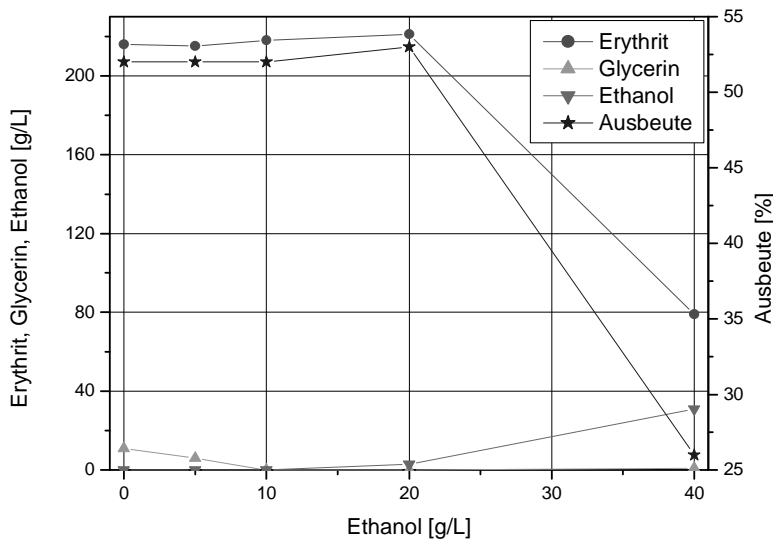


Abbildung 5-18 Auswirkung der Ethanolkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.11, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-19 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ethanol erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Ethanol [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	216	52	220	11	0	31
5	215	52	220	6	0	31
10	218	52	220	0	0	29
20	221	53	220	0	3	27
40	79	26	220	1	31	12
60	----- Kein Wachstum -----					

5.1.7.3 Glycerin

Glycerin wird von vielen Organismen als Schutz gegen schädliche Umwelteinflüsse, insbesondere gegen osmotischen Stress und verminderten Sauerstoffpartialdruck gebildet. Bei der Kultivierung von SZ 101 treten bedingt durch die hohen Substratkonzentrationen hohe osmotische Drücke auf, zudem können während der Kultivierung niedrige Sauerstoffpartialdrücke auftreten. Die vermehrte Bildung von Glycerin wirkt sich nachteilig auf die Ausbeute von Erythrit aus, da Glycerin auf Basis von Dihydroxyacetonphosphat als Produkt der Glycolyse gebildet werden kann.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Glycerin wurden dem Medium Glycerin in fünf unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Glycerin betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.12 hergestellt und die dort angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten.

Die Gegenwart von bis zu 60 g/L Glycerin hat nahezu keine Auswirkung auf die Produktbildung und die Ausbeute. Bei 80 bzw. 100 g/L Glycerin sinken Ausbeute und Erythritkonzentration ab (Abbildung 5-19/Tabelle 5-20).

Es ist also möglich, Glycerinkonzentrationen von bis zu 60 g/L durch die Beimengung von glycerinhaltigen Mutterlaugen zum Medium oder durch die Verwendung von glycerinhaltigen Substraten zu erzeugen, ohne einen Einbruch in der Erythritbildung zu erhalten. Auf eine Glycerinbildung während der Kultivierung ist bis zu einer Konzentration von 60 g/L Glycerin – abgesehen von der verminderten Ausbeute – nicht der Produktbildung abträglich.

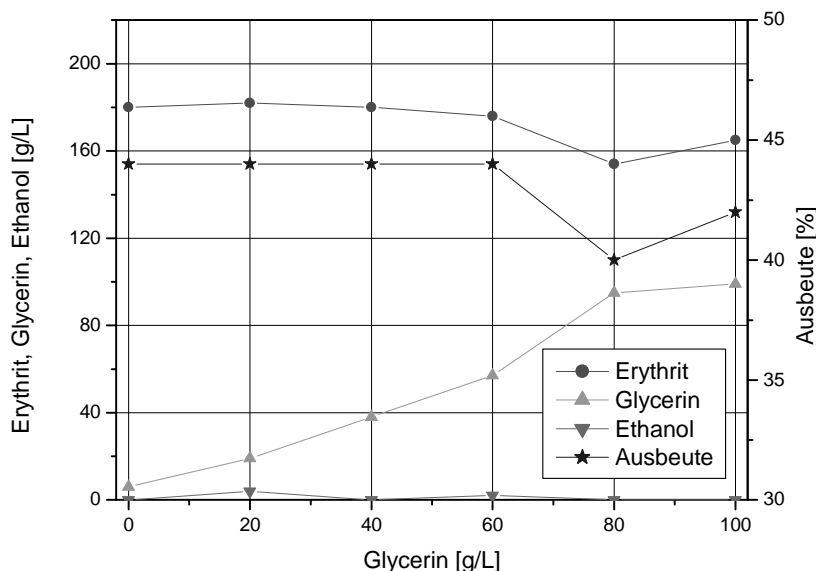


Abbildung 5-19 Auswirkung der Glycerinkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.12, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-20 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Glycerin erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Glycerin [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	180	44	233	6	0	30
20	182	44	238	19	4	31
40	180	44	238	38	0	31
60	176	44	238	57	2	26
80	154	40	238	95	0	25
100	165	42	238	99	0	28

5.1.7.4 Ribit

Ribulose-5-phosphat bildet ein zentrales Intermediat im Pentosephosphat-Zyklus und ist die Vorstufe für Ribulose und damit Ribit. Es wird durch SZ 101 nur in geringen Mengen während der Kultivierung hergestellt. Die Bildung von Ribit vermindert die Ausbeute und Produktivität von Erythrit und ist nicht wünschenswert. Zudem wird durch Ribit die Aufarbeitung der Fermentationsbrühen erschwert. Da die Rückführung von Mutterlaugen als Zuschlag zum Substrat theoretisch möglich ist, würde sich auch bei geringerer Bildung von Ribit dieses sich in der Mutterlauge

ansammeln. Für die Prozesssteuerung ist es entscheidend, die Grenzkonzentration an gebildetem Ribit zu kennen, an der die Fermentation durch Produkthemmung beeinflusst wird.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Ribit wurden dem Medium Ribit in sechs unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt. Zum Vergleich wurde eine Kultur ohne Beimischung von Ribit betrachtet. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.9 hergestellt und die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Mit zunehmender Ribitkonzentration nehmen sowohl Ausbeute als auch die Erythritkonzentration ab, als Folge davon sinken auch die Produktivitäten (Abbildung 5-20, Tabelle 5-21). Die Bildung von Glycerin wird in geringem Maße verringert. Im Gegensatz hierzu tritt eine vermehrte Bildung von Ethanol in allen Versuchsansätzen mit Ribit auf.

Die Gegenwart von Ribit wirkt sich nachteilig auf die Erythritbildung aus. In einer Kultivierung ist die Ribitbildung nach Möglichkeit zu unterbinden, so dass die Erythritbildung nicht gestört wird.

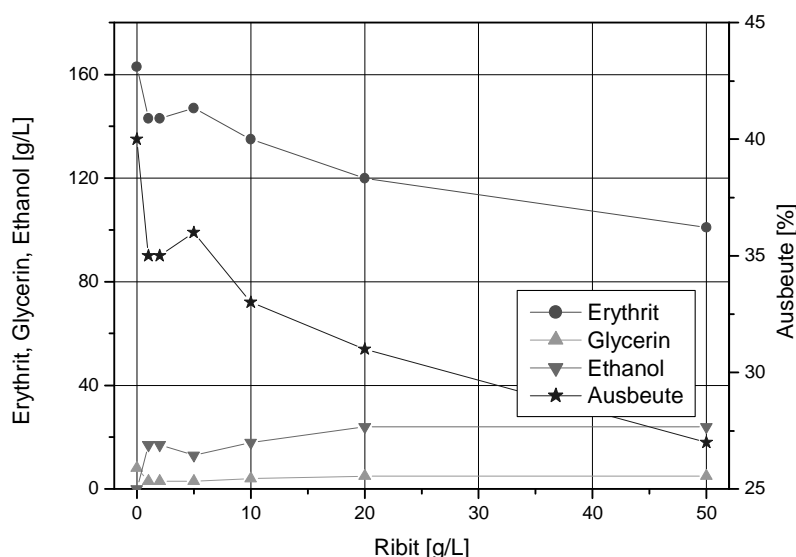


Abbildung 5-20 Einfluss der Ribitkonzentration auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.9, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-21 In den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen an Ribit (4.4.4) erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

Ribit [g/L]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
0	163	40	192	8	0	27
1	143	35	192	3	17	19
2	143	35	192	3	17	19
5	147	36	192	3	13	21
10	135	33	192	4	18	17
20	120	31	192	5	24	15
50	101	27	192	5	24	13

5.2 Untersuchung physiko-chemischer Parameter

5.2.1 Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert gehört zu den wichtigsten Parametern in der Fermentationsentwicklung. Alle Mikroorganismen besitzen einen Toleranzbereich, der von Organismus zu Organismus unterschiedlich ausfällt. Jede Zelle ist bestrebt, den internen pH-Wert auf ihrem optimalen Niveau zu halten. Dies geschieht durch den aktiven Transport von Protonen, der selektiv und sehr energieaufwändig ist. Durch das Unter- oder Überschreiten eines bestimmten pH-Wertes können verschiedene physiologische Reaktionen ausgelöst werden. Hierzu zählen die Umstellung des Stoffwechsels von Wachstumsstoffwechsel auf Erhaltungsstoffwechsel, die Induktion eines bestimmten Gens oder die Einleitung der Sporulation.

Die eukaryontische Zelle ist kompartimentiert. Diese physikalisch abgetrennten Zellbereiche besitzen unterschiedliche pH-Werte, um für die dort arbeitenden Enzyme eine ideale Umgebung zu schaffen.

Der initiale pH-Wert sowie der Verlauf des pH-Wertes während der Kultivierung spielen eine wichtige Rolle für die spätere Prozessführungsstrategie. Je niedriger der anfängliche und im Verlauf der Kultivierung tolerierte pH-Wert ist, desto geringer ist die Gefahr des Fremdbewuchses. Zudem können Kosten eingespart werden, wenn der Prozess nicht im pH-Wert korrigiert werden muss. Andererseits kann durch einen konstanten pH-Wert im optimalen Bereich für den Mikroorganismus der Stress für die Zellen vermindert und ein verbessertes Wachstum und Produktbildung ermöglicht werden.

Zur Untersuchung der Auswirkungen des pH-Wertes wurden Medien in sechs unterschiedlichen pH-Werten hergestellt. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.1 hergestellt und die dort angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten und mit Salzsäure und Natronlauge auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt. Eine Pufferung der Medien erfolgte nicht, der pH-Wert wurde nicht korrigiert.

Betrachtet man die Auswirkungen des initialen pH-Wertes ohne weitere Korrektur im Verlauf der Kultivierung, so stellt man fest, dass mit steigendem pH-Wert steigende Erythritkonzentrationen und Ausbeuten erreicht werden können (Abbildung 5-21, Tabelle 5-22). Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kultivierungen mit anfänglichen pH-Werten von 5, 6 und 7 ist jedoch sehr gering. Da der pH-Wert eines Standardmedium bei 6,5 liegt, würde die Einstellung des Start pH-Wertes auf einen Wert von über 6,5 nur zusätzliche Kosten, jedoch kaum einen Vorteil in Bezug auf die Produktendkonzentration bringen. Die Auswirkungen auf die Ausbeute sind etwas größer und betragen etwa 5 % im Bereich von pH 5 bis pH 7.

Die Herstellung von Erythrit ohne pH-Wert-Regelung ist bei einem anfänglichen pH-Wert von 4-7 möglich und kann für eine weitere Fermentationsentwicklung aufgefasst werden. Da die Prozessführung durch dieses Vorgehen stark vereinfacht wird, werden diese Ergebnisse direkt für die Fermentation übernommen.

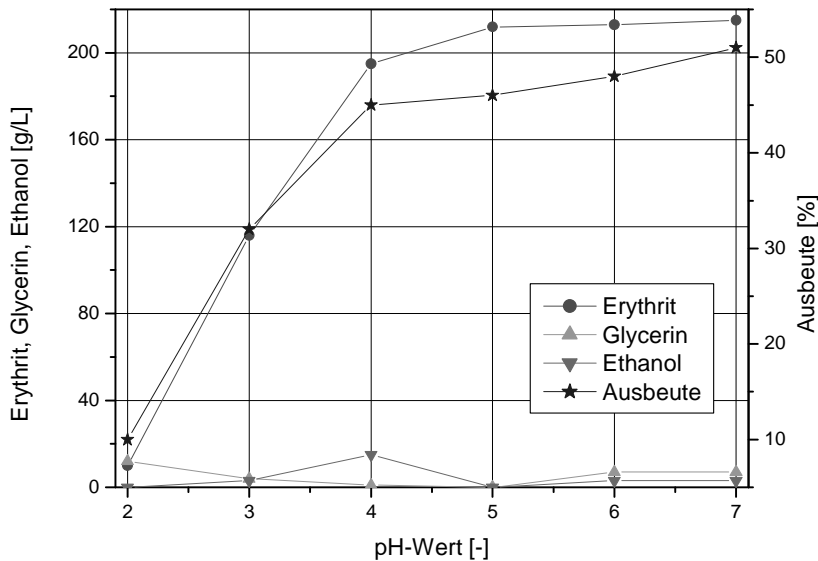


Abbildung 5-21 Auswirkung des initialen pH-Wertes auf die Produktbildung. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ °C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-22 In den Ansätzen mit verschiedenen pH-Werten erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

pH-Wert [-]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
2	10	10	216	12	0	2
3	116	32	216	4	3	41
4	195	45	196	1	15	60
5	212	46	216	0	0	77
6	213	48	196	7	3	78
7	215	51	196	7	3	97

5.2.2 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks

Der Sauerstoffpartialdruck stellt für Hefen einen wichtigen Einflussfaktor für ihren Stoffwechsel dar. Ist der Sauerstoffpartialdruck zu niedrig, schalten viele Hefen von einem aeroben Oxidationsstoffwechsel wie dem Citronensäurecyclus oder dem Pentosephosphatweg auf einen Gärungsstoffwechsel mit den typischen Gärungsprodukten Ethanol und Glycerin um. Technisch ausgenutzt wird dieser Umstand zum Beispiel bei der Herstellung von Bier, bei der Teiggärung, der Weinherstellung, der Ethanolherstellung [283;284;285;286;287;288;289] oder der Glycerinherstellung [290;291;292;293].

5.2.2.1 Untersuchungen im Schüttelkolben

Ausbeute, Produktivität und Selektivität sowie die Biomassebildung sind in aeroben Fermentationen wesentlich durch den Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Die maximale Löslichkeit von Sauerstoff im Verlauf der Kultivierung ist nicht konstant und ist abhängig von der Konzentration der Substrate und Produkte. Die anfänglich maximale Sauerstofflöslichkeit einer 400 g/L Saccharoselösung bei 33 °C beträgt ca. 4,5 mg/L, im Vergleich hierzu ist die maximale Sauerstofflöslichkeit in destilliertem Wasser bei 33 °C 7,22 mg/L (jeweils bei 1013,25 hPa). Um den Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Produktbildung zu untersuchen, wurden Medien nach

4.4.1 hergestellt und die dort angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten. Dabei wurde ein Schüttelkolben mit Schikanen und Gärkappe, ein Schüttelkolben ohne Schikanen und Gärkappe und ein Schüttelkolben mit Schikanen und ohne Gärkappe eingesetzt.

Die meisten Hefen und hefeartig wachsenden Pilze benötigen zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels einen bestimmten Sauerstoffpartialdruck. Es ist bekannt, dass Hefen unter Sauerstoffausschluss vom oxidativen Stoffwechsel auf Gärung umschwenken [153;2;154]. Der Übergangsbereich muss für jeden Fall neu bestimmt werden. Wird die für die Hefe kritische Grenze des Sauerstoffpartialdruckes unterschritten, so tritt die Gärung ein. Der osmophile Pilz SZ 101 bildet in der Gärungsphase die typischen Stoffwechselprodukte Ethanol und Glycerin.

In Vorversuchen im Fermenter wurde mit der Einfluss der Belüftungsrate auf die Fermentation von SZ 101 untersucht. Ist der resultierende Sauerstoffpartialdruck zu gering, werden Gärungsprodukte gebildet, ist er zu hoch, sinkt die Ausbeute und das Biomassewachstum nimmt stark zu.

Um grundlegende Auskünfte über das Verhalten von SZ 101 in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck zu erhalten, wurden Experimente im Schüttelkolben durchgeführt. In diesen lassen sich mit einfachen Mitteln reproduzierbare Ergebnisse erzeugen. Untersucht wurden Kultivierungen unter Sauerstoffausschluss sowie in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen. Hierdurch werden unterschiedliche Leistungseinträge und damit Sauerstoffpartialdrücke realisiert.

Zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke im Medium wurden Kulturen in drei unterschiedlichen Kolben hergestellt. Zur Untersuchung wurden Kulturen nach 4.4.1 hergestellt und die dort angegebenen Versuchsbedingungen eingehalten. Dabei wurde eine Kultur mit einem gasdichten Stopfen verschlossen, eine Kultur in einem Schüttelkolben ohne Schikane aber mit Überwurfkappe und eine Kultur in einem Schüttelkolben mit drei Schikanen und mit Überwurfkappe hergestellt. Eine Pufferung der Medien erfolgte nicht, der pH-Wert wurde nicht korrigiert.

Es zeigte sich, dass SZ 101 unter Verwendung des Standardmediums unter Sauerstoffausschluss fast ausschließlich Ethanol bis zu einer Konzentration von 59 g/L bildet. Glycerin und Erythrit werden nur in Konzentrationen von 10 bzw. 8 g/L gebildet (Abbildung 5-22, Tabelle 5-23).

Die Kultivierung in einem Schüttelkolben ohne Schikanen zeigte auf, dass der Sauerstoffeintrag in diesem Falle zu niedrig war, um die Erythritbildung und das Wachstum positiv zu beeinflussen. Im Gegensatz zur Kultivierung unter Sauerstoffeinfluss wurde jedoch Erythrit bis zu einer Konzentration von 52 g/L gebildet, was dem fünffachen Wert entspricht.

Die Kultivierung in einem Schüttelkolben mit Schikanen lieferte bei gleicher Schüttelfrequenz ein besseres Ergebnis als der Schüttelkolben ohne Schikanen. Es wurden 170 g/L Erythrit erzeugt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde in dieser Kultivierung online mit einer eingebauten Sonde gemessen und aufgezeichnet. Wie gut zu erkennen ist, fällt der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der ersten 12 h unter einen Wert von 2 % und verbleibt dort bis zum vermuteten Absterbebeginn der Kultur. Um diesen Befund auch im Fermenter nachvollziehen zu können, wurde eine entsprechende Regelung programmiert, mit der Sauerstoffpartialdrücke in diesem Bereich eingestellt werden konnten.

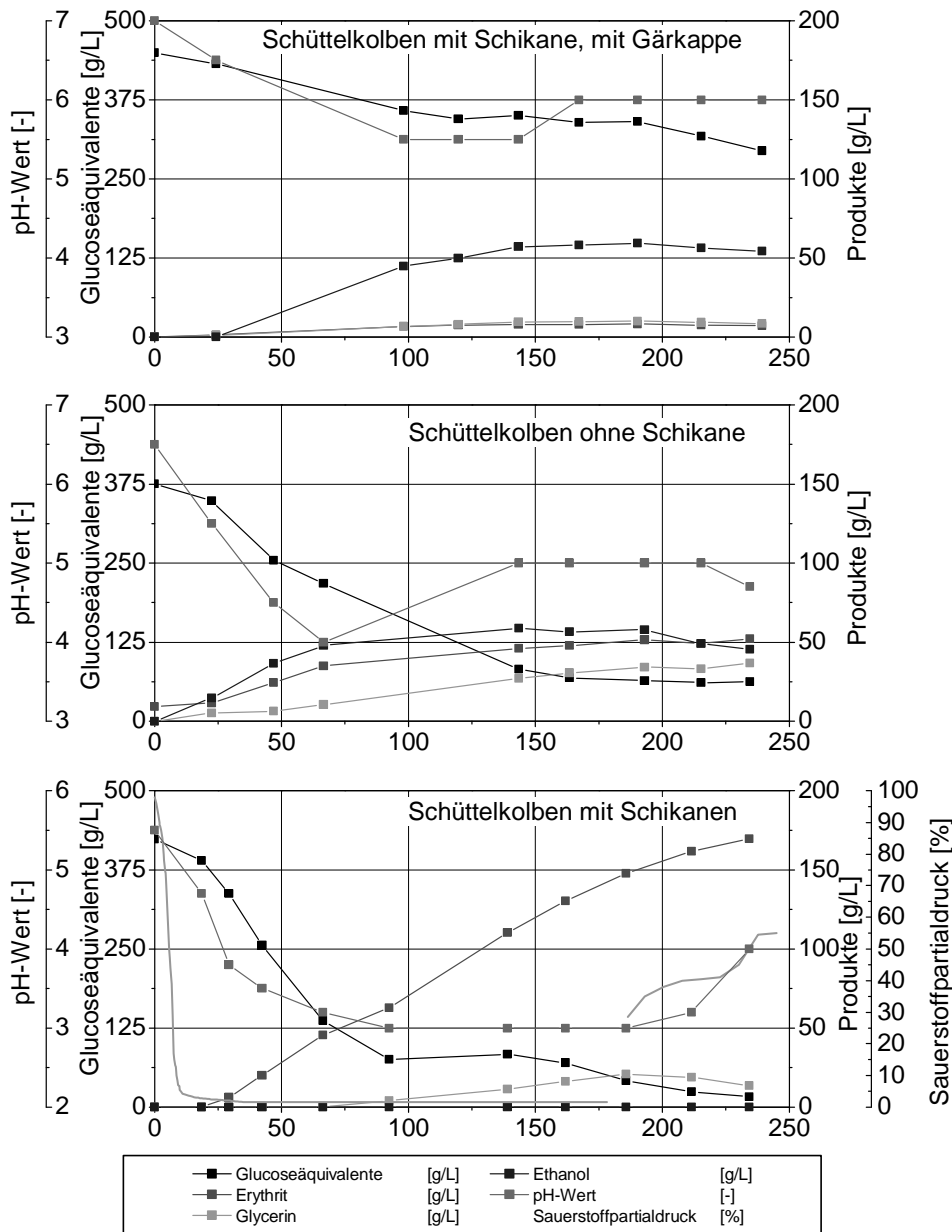


Abbildung 5-22 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Erythritbildung mit SZ 101. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-23 In den Ansätzen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken erreichte mittlere Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration

Sauerstoffversorgung	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
Sauerstoffausschluss ohne Schikane	8	7	193	10	59	3
Sauerstoffausschluss mit Schikane	52	14	243	34	45	8
Sauerstoffversorgung mit Schikane	170	42	234	13	0	29

5.2.2.2 Fermentation bei konstanten Sauerstoffpartialdrücken

Zur Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken wurden Kultivierungen bei 5 % und 15 % Sauerstoffpartialdruck durchgeführt. Zum Einsatz kamen Medien nach 4.4.2 in der Masterfermentereinheit. Der pH-Wert wurde während der gesamten Fermentation auf einen Wert von 5,5 eingestellt, um die Anzahl der veränderlichen Parameter weiter zu vermindern.

Die Erythritbildung setzt in beiden Kultivierungen zu einem Zeitpunkt von 25 h ein und steigt anfänglich rasch an, um bei 140 h ihr Maximum zu erreichen. Da während beider Fermentationen eine sehr starke Schaumbildung auftrat, die einen Großteil der Biomasse aus der Fermentationsbrühe entfernte, sind die Ausbeuten und Erythritkonzentrationen im Vergleich zu anderen Fermentationen mäßig. Es lassen sich trotzdem die Auswirkungen der unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücke nachvollziehen. Die Erythritbildung wird bei niedrigerem Sauerstoffpartialdruck begünstigt. Durch den niedrigen Sauerstoffpartialdruck wird auch mehr Glycerin als bei einem Sauerstoffpartialdruck von 15 %. Die Bildung von Ethanol ist nur bei einem Sauerstoffpartialdruck von 5 % zu beobachten.

Ein Sauerstoffpartialdruck von 5 % ist daher ausreichend (siehe auch Abbildung 5-23), um eine gute Erythritbildung zu ermöglichen.

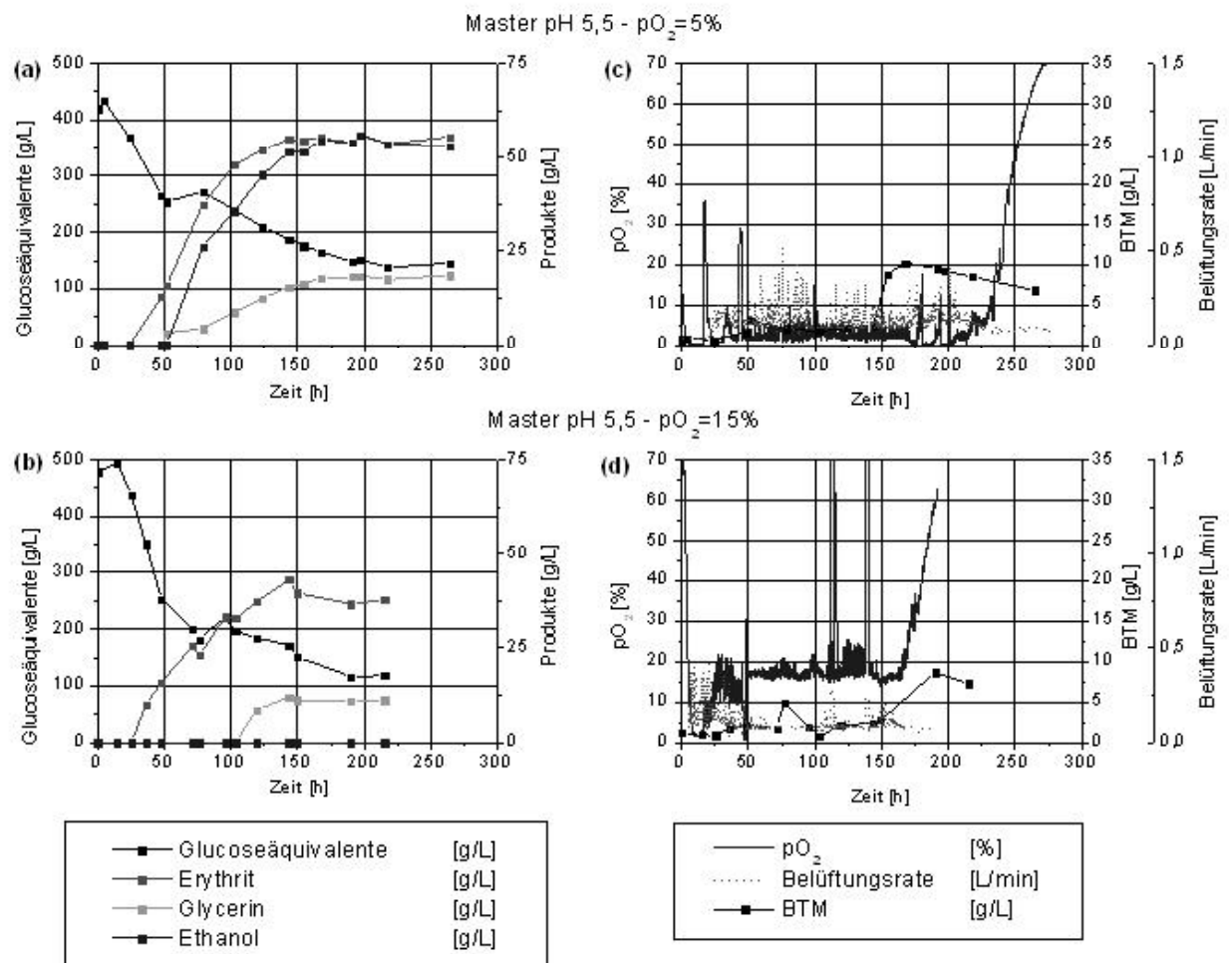


Abbildung 5-23 Fermentation bei konstantem Sauerstoffpartialdruck. Versuchsbedingungen nach 4.4.2, pH konstant bei 5,5, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM

Tabelle 5-24 In den verschiedenen pO_2 -Stufen im Master-Fermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen der Nebenprodukte Glycerin und Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration.

pO_2 -Stufe [%]	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y^P/s [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
5	55,9	20,8	197	18,5	56,1	10
15	46,5	18,2	168	13,7	0,0	8

5.3 Schaumbekämpfung

Bei anfänglichen Fermentationen im Rührkesselbetrieb des Master-Fermenters kam es wiederholt zu starker Schaumbildung, die bei dauerhafter Belüftungsrate größer 1,2 L/min zum Übersäumen des Fermenters und damit zu signifikantem Biomasseverlust führte. In der Regel musste eine Fermentation bei Übersäumen abgebrochen werden. Aber auch bei niedrigeren Belüftungsraten entstand eine dauerhafte Schaumkrone. Durch den angelegten Belüftungsstrom trockneten die oberen Schaumschichten schnell ein, wurden dadurch aber nicht destabilisiert, sondern blieben bestehen. Es musste daher nach einer effizienten Schaumbekämpfung gesucht werden. Ein neuartiges Schaumbekämpfungssystem wurde daraufhin entwickelt, konstruiert und gebaut.

5.3.1 Konstruktion eines Schaumberegners

Zur Minimierung der durch das Schäumen der Kultur gegebenen Beeinträchtigungen bei der Erythritausbeute wurde ein Schaumberegner auf der Basis eines modifizierten Scheibenrührers konstruiert (Abbildung 5.12).

In Untersuchungen mit sterilem Standardmedium erfolgte eine Mediumsförderung durch das Staurohrprinzip ab ca. 500 UpM. Auch im Fermentationseinsatz überzeugte die Leistung der Konstruktion. Zudem erlaubt dieser Beregner eine konstante und kontinuierliche Schaumzerstörung und verhindert erfolgreich das Übersäumen des Fermenters unter den untersuchten Bedingungen. Mit der Konstruktion des Beregners wurden zwei Probleme gleichzeitig gelöst. Zum einen trocknet der Schaum bei Einsatz der Konstruktion nicht mehr ein, da er kontinuierlich mit Fermentationsbrühe beregnet wird. Zum anderen wird der Schaum aktiv zerstört und die darin fixierte Biomasse dem Reaktionsraum wieder zugeführt. Bei einer Anlage mit vertikaler Beregnung wurde eine Mindesttropfengeschwindigkeit zur Zerstörung von Schaumlamellen von ca. 4 m/s bestimmt [278]. Diese Geschwindigkeit wird bei der vorliegenden Konstruktion theoretisch ab einer Umdrehungsgeschwindigkeit von ca. 750 UpM erreicht. Die experimentellen Befunde bestätigen eine deutliche Effizienzsteigerung des Schaumzerstörers ab einer Drehzahl von ca. 800 UpM.

Die Schaumbildung im Allgemeinen konnte erwartungsgemäß nicht unterdrückt werden. Bei Kultivierungen ohne Schaumbekämpfung wurden um Teil bis zu 3 Liter des Mediums in Schaum umgesetzt, der sehr wahrscheinlich einen nur sehr geringen Anteil an der Produktionsleistung hatte. Somit entfällt im Falle der Schaumbildung Volumen als auch Biomasse zur Produktion von Erythrit.

Die Vorteile der Schaumbekämpfung mit arteigener Flüssigkeit mit dieser Konstruktion liegen in der kurzen Aufenthaltszeit des Mediums in dem Staurohr, da keine langen Bypass-Strecken überwunden werden müssen. Damit wird ein anaerober Zustand mit negativen Auswirkungen auf die Erythritbildung vermieden.

Ein weiterer Vorteil ist die platzsparende und einfach auszuführende Bauweise des Schaumberegners.

5.3.2 Schaumkontrolle über Rührerleistung

In Kombination mit dem Schaumberegner konnte auch bei maximaler Schaumbildung ein Überschäumen effektiv verhindert werden. Dabei half die stündliche Anhebung der Rührerdrehzahl, den bestehenden Schaum einzurühren und gleichzeitig die Schaumbildung durch Scherung der Zellen minimal zu halten.

5.3.3 Schaumbekämpfung durch Schaumbekämpfungsmittelzugabe

Die Schaumbekämpfungsmittelzugabe zeigte nur im Anfangsstadium der Kultur einen positiven Effekt, der in Phasen maximaler Schaumbildung aber gegen Null tendierte. Hierbei zeigten weder kommerziell erhältlich Schaumbekämpfungsmittel auf Basis epoxidierter Fettsäuren noch die Zugabe unterschiedlicher natürlicher Öle (Rapsöl, Distelöl, Sonnenblumenöl, Leinöl) eine Wirkung.

5.3.4 Fazit der Schaumbekämpfungsmaßnahmen

Eine kontrollierte und damit reproduzierbare Fermentation wurde auf der Grundlage der Verwendung des Schaumberegners und der zusätzlichen chemischen und mechanischen Schaumbekämpfung ermöglicht. Erst hierdurch konnten Fermentationen zur Untersuchungszwecken herangezogen werden. Die Problematik der durch die Schaumbildung beeinflussten Produktionsleistung wird an anderer Stelle diskutiert.

5.4 Einfluss der Fermentergeometrie

In Vorversuchen wurden der Master-Fermenter und der Satelliten-Fermenter als Umwurfreaktoren betrieben. Mit der Standard-Belüftungssteuerung zur Regelung des Sauerstoffpartialdrucks konnte jedoch das benötigte mikraerobe Milieu nicht etabliert werden. Mit der in dieser Arbeit programmierten Belüftungsstrategie (siehe 4.6.1.3) konnte dieser Nachteil ausgeglichen werden. Zur Ermittlung der Auswirkungen der Fermentergeometrie auf die Erythritbildung wurden im Master- und im Satelliten-Fermenter Fermentationen bei einem Sauerstoffpartialdruck von 5 % gefahren. Die Prozesssteuerung der Fermentationen erfolgte nach identischen Vorgaben. Wie die Ergebnisse in den Schüttelkolbenversuchen zeigen, können auch bei unregelmäßigem pH-Wert hohe Erythritkonzentrationen erreicht werden. Bei Fermentationen im industriellen Maßstab stellen Neutralisationsmittel einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar. Aus diesen Gründen wurde bei den hier beschriebenen Fermentationen auf eine Statisierung des pH-Wertes verzichtet. Es wurden Medien nach 4.4.2 hergestellt.

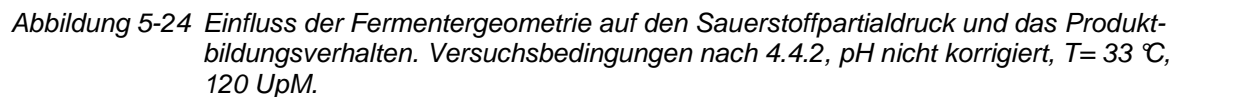
Der Vergleich der untersuchten Metabolite zeigt prinzipiell für beide Fermenter ähnliche Verläufe (Abbildung 5-24, Tabelle 5-25). Im Master blieb die Konzentration an Glucoseäquivalenten für die ersten 40 h nahezu unverändert, danach fiel diese steil bis auf ein Plateau um 55 g/L. Im Satelliten fiel die Glucoseäquivalentkonzentration ebenfalls steil ab, erreichte ein Plateau bei ca. 80 g/L und sank im weiteren Verlauf bis auf 10 g/L ab.

Die Erythritausscheidung setzte bei beiden Ansätzen nach ca. 25 h ein. Beim Master stieg die Konzentration zunächst steil, später langsamer an und erreichte ein

Maximum von knapp 176 g/L nach 263 h. Die Fermentation im Satelliten zeigt anfangs einen ähnlichen Verlauf der Erythritausscheidung, die aber bis ca. 190 h linear anstieg und eine Maximalkonzentration von 189 g/L erreichte. Die Nebenproduktspektren zeigen recht ähnliche Verläufe. Ethanol wurde nicht gebildet. Glycerin wurde im Master erst ab 75 h stetig gebildet und reicherte sich bis auf eine Konzentration von 34 g/L an. Im Satelliten-Fermenter wurde bereits nach 50 h Glycerin gebildet, dessen Konzentration auf 54 g/L stieg.

Wie Abbildung 5-24 zeigt, liegen die Ausbeuten für Erythrit hoch. Die Fermentationsdauer betreffend liegen die Fermentationen knapp 70 h auseinander, wenn man das frühe hohe Konzentrationsniveau des Erythrits im Satelliten-Fermenter beachtet. Die Konzentrationen an gebildetem Glycerin liegen recht hoch, werden aber durch die ebenfalls hohen Erythritkonzentrationen relativiert. Ethanol wurde nicht gebildet.

Die im Satelliten-Fermenter erzielten Erythritkonzentrationen übertreffen die des Master-Fermenters deutlich. Dies ist vermutlich auf die Geometrie des Satelliten-Fermenters, insbesondere auf das günstige Verhältnis von Höhe zu Durchmesser ($H/d = 0,7$), zurück zu führen. Dabei bewirkt die größere Höhe beim Master-Fermenter ($H/d = 2,7$) bei starker Belüftung ein Flotieren der Biomasse. Die im Schaum fixierte Biomasse entfällt somit zur Produktion von Erythrit. Zudem sterben die Pilzzellen im Schaum schneller ab und verstärken damit die Schaumbildung zusätzlich. Mit eingesetztem Umwurfsystem wurden beim Master-Fermenter Verbesserungen erzielt, da auf diese Weise der Schaum deutlich besser durch Einrühren in die Fermentationsbrühe zurückgeführt wurde.



Fermenter	Max. Erythritkonzentration [g/L]	Ausbeute Y ^P / _S [% (w/w)]	Zeitpunkt [h]	Glycerin [g/L]	Ethanol [g/L]	BTM [g/L]
Master	176	45,7	263	34	0	47
Satellit	189	46,6	242	54	0	54

5.5.1 Fermentation mit LentiKats®

91

Die Kultivierung ergab mit 41 g/L Erythrit bei einer Ausbeute von 13 % ein deutlich schlechteres Ergebnis als Kultivierungen mit freien Zellen. Es wurde eine maximale Konzentration an freier Biomasse von 9 g/L erreicht. Die Biomassekonzentration in den Immobilisaten konnte nicht bestimmt werden, da bei einem Aufschmelzen des Gels die Zellen zerstört werden und die Biomasse daher nicht bestimmt werden kann.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Immobilisierungsschritt noch größere Probleme in der Sauerstoffversorgung aufwirft als ein Prozess mit freien Zellen. Während der Kultivierung der Immobilisate wachsen zunächst die einzelnen Zellen des Gels. Die an der Oberfläche des Gels befindlichen Kolonien wachsen durch die im Verhältnis zu Kolonien weiter im Innern des Immobilisates schneller, werden so groß, dass sie aufplatzen und entlassen Zellen in das Medium. Durch deren Vermehrung kommt es zur Bildung von freier Biomasse im Medium. Somit ist der Vorteil der vereinfachten Abtrennung der biokatalytisch aktiven Zellen aus dem Medium geschmälert.

Es ergeben sich bei gleichzeitigem Vorliegen von freier, suspendierter Biomasse und immobilisierter Biomasse zwei mögliche Richtungen für die Kultivierung:

Sind die immobilisierten Zellen nicht sauerstofflimitiert, so liegt bedingt durch den Sauerstoffgradienten im Immobilisat ein für die freien Zellen zu hoher Sauerstoffpartialdruck vor. Die freien Zellen wachsen somit stark ohne Produktbildung. Liegt ein für die freien Zellen optimaler Sauerstoffpartialdruck vor, so sind die Zellen in den Immobilisaten sauerstofflimitiert und bilden die Gärungsprodukte Glycerin und Ethanol. Die Kultivierung in Abbildung 5-25 folgte dem zweiten Verlaufstyp, es wurden sehr viele Gärungsprodukte gebildet.

Da durch die Immobilisierung in PVAL weder eine Erhöhung der Ausbeute noch eine Erhöhung der Erythritkonzentration erreicht werden konnte, scheidet eine Immobilisierung in LentiKats für ein Produktionsverfahren aus. Die Prozessführung wird durch die Tatsache erschwert, dass für die Erythritbildung an zwei Stellen, nämlich in der Kolonie im Immobilisat und in der Fermentationsbrühe, der gleiche Sauerstoffpartialdruck eingestellt werden müsste. Dies ist jedoch technisch nicht möglich.

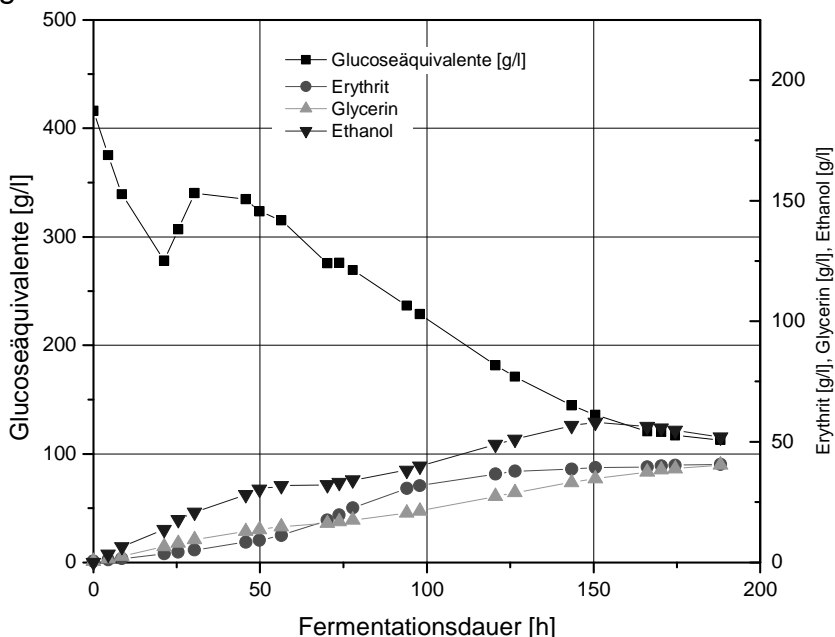


Abbildung 5-25 Fermentation mit in LentiKats® immobilisierten Zellen. Versuchsbedingungen nach 4.4.1, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM .

5.5.2 Fermentation mit Calcium-Alginat-Perlen

Die Konzentration der anfänglichen Biomassekonzentration in der Immobilisaten spielt für den Verlauf der Kultivierung eine beträchtliche Rolle. Untersucht wurden Calcium-Alginat-Kugeln mit unterschiedlicher Biomassebeladung in einem nicht pH-statisierten Rührkessel. Zur Untersuchung des Einflusses der Biomassebeladung wurden Medien nach 4.4.1, jedoch mit 15 g/L Hefeextrakt verwandt.

Eine zu geringe Beladung der Immobilisate führt dazu, dass sich nur wenige, dafür aber sehr große Kolonien innerhalb des Immobilisats ausbilden. Diese Kolonien haben zwischen einander einen großen Abstand. In den Kolonien selbst ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nur in den äußersten Schichten der Kolonie gut, im Inneren des Immobilisats herrschen limitierende Verhältnisse.

Mit zunehmender Biomasseanfangsbeladung wachsen im Immobilisat mehr Kolonien, die kleiner sind. Der Abstand zwischen den Kolonien sinkt, die Versorgung bleibt jedoch gleich gut. Durch die geringere Koloniegröße kommt es nicht mehr zu Gradienten in der Versorgung innerhalb der Kolonien. Mit zunehmender Biomasseanfangsbeladung wird das Immobilisat an der Oberfläche so stark von Kolonien besetzt sein, dass der Abstand zwischen den Kolonien an der Oberfläche so klein ist, dass alles im Medium befindliche Substrat und der gelöste Sauerstoff bereits an der Oberfläche des Immobilisats verbraucht wird. Da während eines langen Zeitraumes der Kultivierung die Substratkonzentration so hoch ist, dass die Abbaugeschwindigkeit des Substrates in den obersten Schichten des Immobilisates geringer ist als der Stofftransport in das Innere des Immobilisates, wird das Innere des Immobilisats immer noch mit Substrat versorgt.

Die Sauerstoffzehrung in den oberen Schichten des Immobilisats ist jedoch größer als der Transport ins Innere, so dass im Inneren des Immobilisats Sauerstoff limitierte Verhältnisse vorliegen. Bei der verwendeten Hefe führt ein niedriger Sauerstoffpartialdruck zum teilweisen Umschalten des Stoffwechsels auf Gärungsstoffwechsel. Das im Innern des Immobilisats vorliegende Substrat wird also zu Ethanol und Glycerin umgesetzt.

Wie aus den Fermentationsverläufen zu erkennen ist, ist der Verlauf der Glucoseäquivalente bei allen untersuchten Biomassebeladungen sehr ähnlich. Deutliche Unterschiede ergeben sich beim der Erythritkonzentration zum Ende der Fermentation hin. Bei 2 % und 5 % Biomassebeladung liegt die erreichte Erythritkonzentration ohne Zufütterung von Substrat über den erreichten Werten der Biomassebeladungen von 1 % und 9 %. Da bei 2 % und 5 % Biomassebeladung eine deutliche Ergebnissteigerung durch Zufütterung zu erwarten war, wurde diesen beiden Kultivierungen Substrat zugefüttert.

Die maximale Konzentration und Ausbeute wurde im Ansatz mit 2 % Biomassebeladung erzielt, gefolgt von einer bereits deutlich niedrigeren Erythritkonzentration, jedoch nur wenig verminderten Ausbeute bei 5 % Biomassebeladung.

Mit der Bildung von Glycerin nimmt bis zu einer Biomasseanfangsbeladung von 5 % zu. Bei einer Biomassebeladung von 9 % wird eine fast konzentrationsgleiche Bildung von Erythrit und Glycerin erreicht. Für die Ethanolbildung ist kein eindeutiger Trend vorherzusagen, mit zunehmender Biomassekonzentration sollte auch die Ethanolbildung zunehmen. Es ist möglich, dass durch die Begasung während der Kultivierung mit dem Abgas Ethanol aus der Produktlösung ausgestrippt worden ist und dadurch eine eindeutige Aussage – trotz der Verwendung eines Abgaskühlsystems – unmöglich gemacht wird. Dies steht im Einklang zu der bereits vorhergesagten Entwicklung der Produktverläufe für Glycerin und Erythrit.

Die simultane Bildung von Glycerin und Erythrit würde bei ausreichend hohen Konzentrationen der beiden Produkte eine wirtschaftlich attraktive Lösung für die simultane Bereitstellung von Erythrit und Glycerin bedeuten. Eine Verminderung der Stabilität der Calcium-Alginat-Kugeln wurde nicht beobachtet.

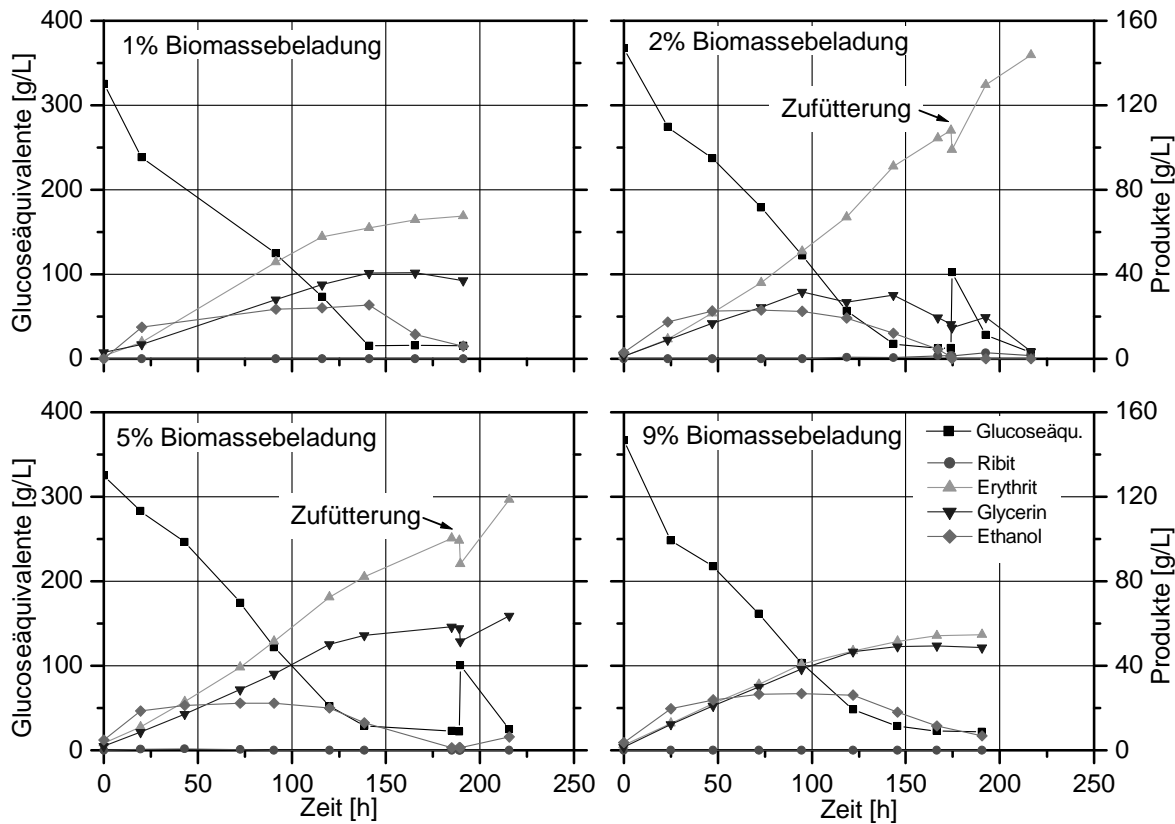


Abbildung 5-26 In den Fermentationen mit unterschiedlicher Biomassebelastung im Satellitenfermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Versuchsbedingungen nach 4.4.1 mit 15 g/L Hefeextrakt, pH nicht korrigiert, $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 UpM.

Tabelle 5-26 In den verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Biomassebelastungen im Satellitenfermenter erreichte Produktkonzentrationen und Ausbeuten. Die Konzentrationen des Nebenprodukts Ethanol sowie der Biotrockenmasse beziehen sich auf den Zeitpunkt der maximalen Erythritkonzentration. Der Biotrockenmassegehalt bezieht sich auf den Gesamtgehalt, der sich aus freier Biomasse und Biomasse im Immobilisat zusammensetzt.

Biomassebelastung	Erythrit					Glycerin					
	$Y_{P/S}$ [% (w/w)]	P [g/lh]	Max. Produktkonzentration [g/l]	BTM [g/l]	Zeit [h]	$Y_{P/S}$ [% (w/w)]	P [g/lh]	Max. Produktkonzentration [g/l]	BTM [g/l]	Zeit [h]	
1 %	21,4	0,35	68	23	191	12,1	0,23	41	20	141	
2 %	31,7	0,66	144	71	216,5	12,3	0,32	32	12	95	
5 %	30,5	0,55	119	54	215,5	16,3	0,29	64	54	215,5	
9 %	15,0	0,31	55	17	166,5	14,0	0,33	49	21	145,5	

6 Ökonomische Betrachtungen

6.1 *Situationsbeschreibung*

Zur ganzheitlichen Betrachtung eines Produktes gehören auch die wirtschaftlichen Aspekte. Gerade die Entwicklung eines Prozesses, der langfristig die industrielle Produktion als Ziel anstrebt, darf die Gewinnorientierung eines Unternehmens nicht aus den Augen verlieren.

Daher sind verschiedene Aspekte zu betrachten: gibt es einen Bedarf für das Produkt, für welchen Preis kann das Produkt verkauft werden, wird durch das Produkt ein neuer Markt geöffnet oder nur ein herkömmliches (gar eigenes) Produkt verdrängt, wie ist die patentrechtliche Situation, welche Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen bei der Herstellung und späteren Weiterverarbeitung sind einzuhalten, wie kann das Produkt lagerfähig gemacht werden, wie lange ist das Produkt lagerfähig, müssen vor der Markteinführung Untersuchungen hinsichtlich gesundheitlicher Risiken und möglicher Umweltbelastungen durch das Produkt durchgeführt werden?

Um den in der Industrie hinreichend bekannten Fehler zu vermeiden, eine Prozess- und Produktentwicklung durch die Forschungsabteilung und ohne Rücksprache mit anderen Unternehmensteilen wie beispielsweise Produktion, Marketing, Vertrieb, Kalkulation und Rechtsabteilung durchzuführen, wird hier eine erste Wirtschaftlichkeitsbetrachtung vorgenommen. Dafür werden die Herstellkosten des Produktes Erythrit ermittelt, in dem die Anlagen und Betriebskosten zusammengestellt werden.

6.2 *Verfahrensfließbild*

Im Nachfolgenden sind ein Grundfließbild (Abbildung 6-1) und ein Verfahrensfließbild (Abbildung 6-2) für die industrielle Herstellung von Erythrit durch Fermentation aufgeführt. In den Fließbildern sind keine Zusatzangaben wie Stoffströme oder Materialgütern der verwendeten Komponenten vermerkt. Mess-, Steuer- und Regeleinrichtungen sind ebenfalls nicht aufgeführt.

6 Ökonomische Betrachtungen

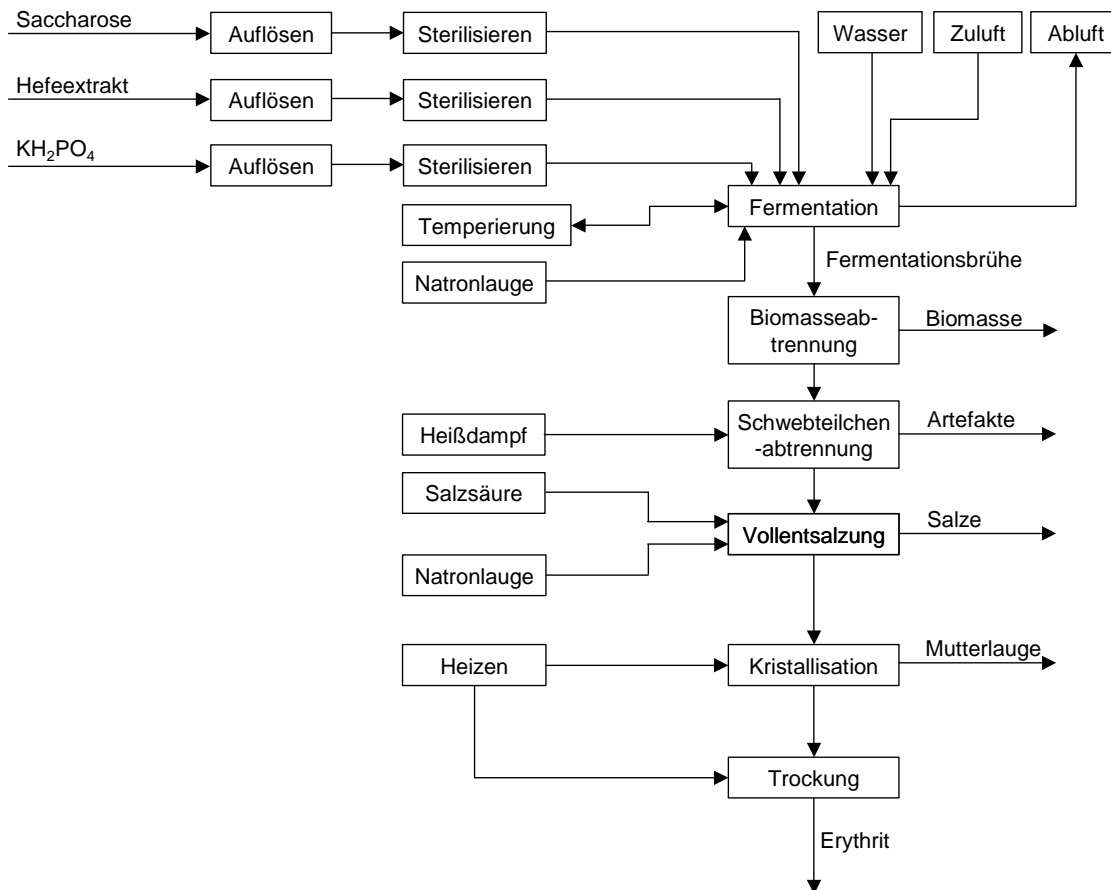


Abbildung 6-1 Grundfließbild zur fermentativen Herstellung von Erythrit nach DIN 28004

Das in Abbildung 6-1 abgebildete Grundfließbild weist einen vollständigen Prozessablauf einer Anlage zur Herstellung von Erythrit mittels Fermentation auf. Die wesentlichen Prozessschritte sind hierbei Auflösen der Medienbestandteile, anschließendes Sterilisieren, Fermentation, Abtrennung der Biomasse und Schwebeteilchenabtrennung, Vollentsalzung, Kristallisation und Trocknung. Für die Auslegung einer Produktionsanlage in dieser Arbeit wird ein Grundfließbild nach Abbildung 6-1 – jedoch ohne Vollentsalzung – zu Grunde gelegt

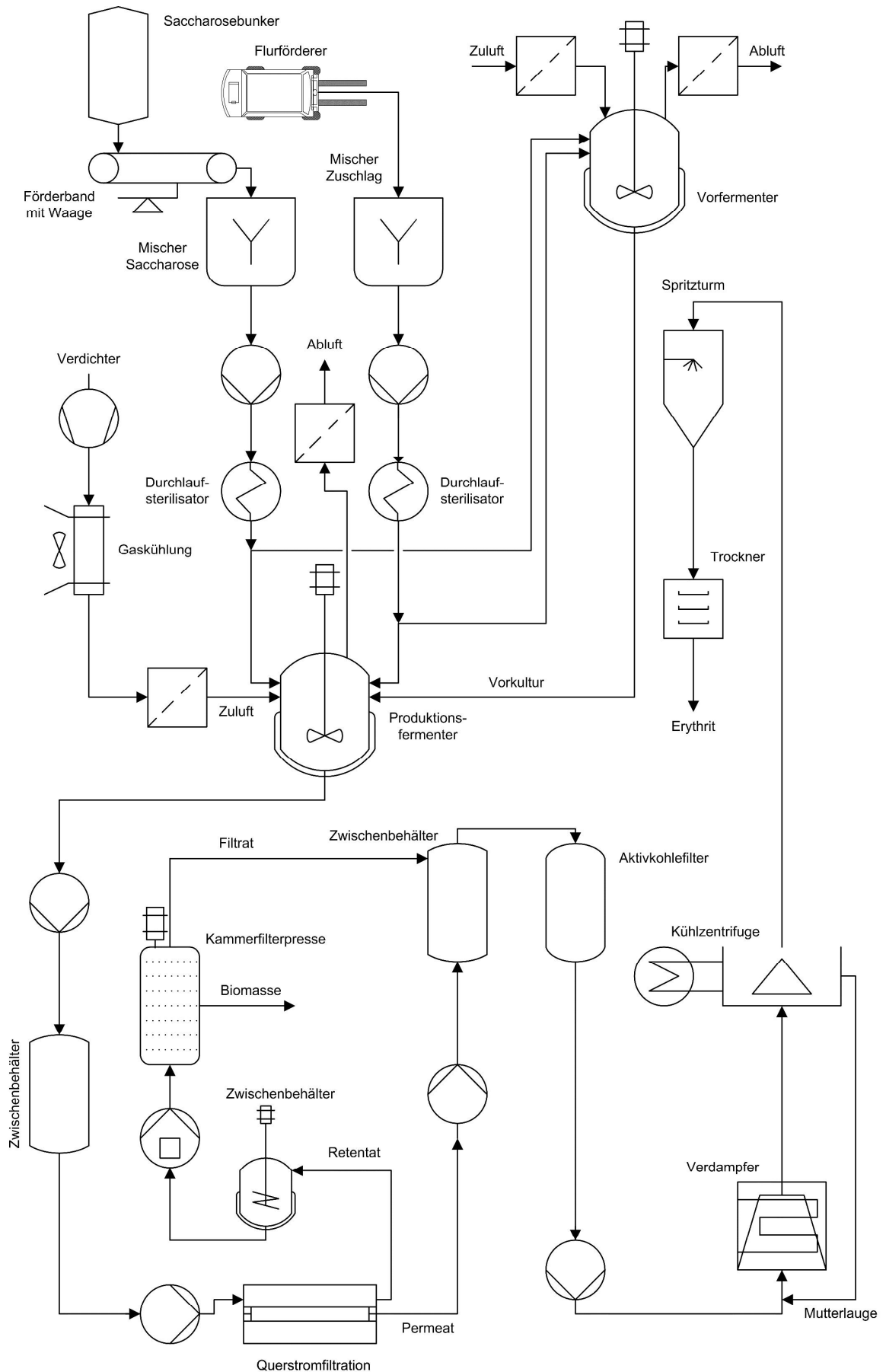


Abbildung 6-2 Verfahrensfliessschema für die industrielle Herstellung von Erythrit nach DIN 28004

6.3 Ermittlung der Herstellkosten

Zur Abschätzung der Herstellungskosten wurden Ergebnisse dieser Arbeit verwandt. Die Berechnung der Herstellungskosten erfolgt auf Basis einer Anlage mit mindestens 5.000 t/a Herstellungskapazität. Bei der Berechnung wird die Anlage als Annexanlage an eine bestehenden Zuckerfabrik betrachtet. Die Kosten für Grundstückserwerb und –erschließung entfallen damit. Die Betriebsmittel wie Wärme, Dampf und Strom werden aus der bestehenden Anlage bezogen und somit nur die reinen Verbrauchskosten in Rechnung gestellt.

Diese Kostenabschätzung bezieht sich allein auf die Gewinnung des Hauptproduktes Erythrit. Die Gewinnung von Nebenprodukten wie Glycerin oder Ethanol wird nicht mit in Betracht gezogen. Die bei der Herstellung anfallenden Reststoffe werden kostenneutral in einer betriebseigenen Biogasanlage entsorgt. Da für die Herstellung keine Chemikalien verwandt werden, die später als Sondermüll entsorgt werden müssen, können die Abwässer in einer betriebseigenen Biogas-/Kläranlage behandelt werden.

Die Herstellung besteht aus den einzelnen Schritten Vorkultur, Produktionsfermentation, Biomasseabscheidung, Eindampfung, Kristallisation und Trocknung.

6.3.1 Vorkultur

Für die Erneuerung der Biomasse in der Produktion mit suspendierten Zellen wird eine Neuimpfung mit Vorkultur für jede Produktionsfermentation angesetzt.

Es wird bei der Vorkultur-Vermehrung von einer Fermentationszeit von 50 h und einer Scale-up-Rate von 1:20 ausgegangen.

Die Vorkulturkannten werden anteilig von der Hauptfermentation berechnet. Hierbei wird unter Einbeziehung der Scale-up-Rate und eines entsprechenden Kostenexponenten sowie eines angepassten Preises für Laborchemikalien und –fermenter (für Fermenter $< 1 \text{ m}^3$) ein prozentualer Wert für die Investitions- und Bedarfskosten der Vorkultur ermittelt.

Bedingt durch die im Vergleich zur Produktionsfermentation kürzere Zeit der Vorkultivierung kann durch eine geeignete Verschachtelung der Produktionsfermentationen der Bedarf an Vorkultivierungskapazität minimiert werden. Diesem wird durch ein entsprechendes Modell Rechnung getragen. Für die Kostenrechnung wird für das Nutzvolumen der Fermenter einheitlich 80% des Gesamtvolumens zu.

Für die Einrichtungen der Vorkultur wird – trotz der geringeren Auslastung – wie bei den Produktionseinrichtungen von einer Abschreibung über 10 Jahre und 2% Reparaturkosten ausgegangen. Eine direkte Verrechnung der Kosten ist daher möglich.

6.3.2 Produktionsfermentation

Saccharose wird über Bandwaage und Bandförderer dem Zwischenbehälter entnommen und dem Anmischbehälter zugeführt. Die Pufferkapazität des Zwischenbehälters beträgt etwa 40 h Produktion der Fermentation (Abbildung 6-2). Die Saccharoselösung wird in einem Behälter mit Rührwerk angesetzt und zur Sterilisation durch einen Durchlauferhitzer mit Wärmerückgewinnung geleitet. Von dort wird sie dem jeweiligen Fermenter zugeführt.

Die Stickstoffquelle und die sonstigen Medienzusätze werden aus getrennten Zwischenbehältern mit einer Kapazität von mehr als einer Produktionswoche mittels

Gabelstapler dosiert in den Zuschlagmischbehälter übergeben. Von dort wird das Gemisch ebenfalls zur Sterilisation in einen Durchlauferhitzer mit Wärmerückgewinnung geleitet und von in den aktuellen Produktionsfermenter geleitet.

Die Zwischenzeit (Totzeit) zwischen zwei Produktionszyklen (u.a. Entleerung, Reinigung, Befüllung, Sondenwechsel) wird mit 8 Stunden für Kulturen mit suspendierte Zellen angesetzt.

Für Behältersterilisation u.a. werden 20 kWh Dampf / m³ Reaktionsraum und für die Behälterkühlung 0,05 m³ Kühlwasser / m³ Suspension in Rechnung gestellt.

Die Belüftung der Fermenter erfolgt mittels Schraubenverdichter. Die Zuluft wird durch Sterilkerzenfilter in die Fermenter geleitet. Die Abluft wird nach Entfeuchtung ebenfalls durch Sterilkerzenfilter keimfrei gemacht.

Für die Zwischenspeicherung von suspendiertem Impfgut ist ein zusätzlicher Behälter mit entsprechendem Zubehör vorgesehen.

6.3.3 Biomasseabscheidung

Die Fermentationsbrühe wird von den Reaktoren in einen Zwischenbehälter geleitet und von dort wird mittels einer Querstromfiltrationsanlage die Biomasse bis zu einer Konzentration von maximal 25 % (w/v) eingeeengt. Das von der Biomasse befreite Permeat wird mit dem Filtrat des nachfolgenden Schrittes vereinigt und vor der weiteren Behandlung zur Entfernung von Artefakten über Aktivkohle gefiltert. Das biomassereiche Retentat wird zur weiteren Einengung in einen Zwischenbehälter geführt und von dort einer Kammerfilterpresse zugeführt. Der Filterkuchen wird gesammelt und in einer betriebseigenen Biogasanlage kostenneutral entsorgt. Das Filtrat wird mit dem Permeat der Querstromfiltrationsanlage vereinigt und mit diesem weiter behandelt.

6.3.4 Eindampfung

Vor dem Eindampfen des Permeats wird dieses von Artefakten mittels Aktivkohle befreit. Eine Vollentsalzung ist ebenfalls möglich, wird in dieser Kostenermittlung jedoch nicht betrachtet, da eine Kristallisation auch direkt aus der Mutterlauge möglich ist.

Die Eindampfung findet in einem vierstufigen Verdampfer statt, um eine möglichst hohe Wärmeausbeute zu erreichen. Hierbei wird mit dem Brüden der Vorstufe jeweils die nachfolgende Verdampferstufe geheizt, dass unter dem reduzierten Druck dieser Verdampferstation das Wasser weiter verdampft werden kann [279]. Die Erythritlösung hat beim Verlassen der letzten Verdampferstufe eine Erythritkonzentration von 85 % und eine Temperatur von 70 °C. Die Eintrittskonzentration der einzudampfenden Flüssigkeit wird von der Erythritkonzentration der Fermentationsbrühe bestimmt.

6.3.5 Kristallisation

Die Ausscheidung der Erythritkristalle erfolgt durch Abkühlung des mit 70 °C den Verdampfer verlassenden Eluates auf etwa 15 °C in 7 h unter stetigem Rühren. Nach dem Zentrifugieren wird ein Waschgang (20% Sprühwasser bezogen auf Kristallmasse) und anschließende Trocknung vorgesehen.

Die Mutterlauge wird erneut mit frischer eingedampfter Erythritbrühe vermischt um die Ausbeute zu erhöhen. Eine häufige Wiederholung der Vermischung von

Mutterlauge und frisch eingeeengter Erythritbrühe ist jedoch nur möglich, wenn die Fermentationsbrühe frei von Nebenprodukten, insbesondere Oligosacchariden ist. Oligosaccharide erhöhen die Viskosität der Maische und verlangsamen so das Kristallwachstum und die Abtrennbarkeit der Kristalle aus der Maische.

6.3.6 Allgemeines

Die Berechnung der Kosten der einzelnen Komponenten folgt einem degressiven Preismodell nach Gleichung 6-1. Hieraus folgt, dass mit zunehmender Anlagenkapazität der kapazitätsbezogene Preis sinkt. Für die Komponenten wird der generische Degressionsexponent von 0,6 angenommen.

$$\frac{K_1}{K_2} = \left(\frac{X_1}{X_2} \right)^m \quad \text{Gleichung 6-1}$$

K	[EUR]	Kosten
X	[variable Einheit]	Kapazität
M	[-]	Degressionsexponent

Der Kühlwasserbedarf von Kondensatoren und Nachkühlern wird einheitlich mit 0,35 m³ Kühlwasser / m³ Brüden angesetzt [294].

Zur Bestimmung des elektrischen Energiebedarfs wurden die Nennleistungen der Pumpen und Rührwerke benutzt. Für diese Komponenten wurde eine einheitliche Auslastung von 70 % angesetzt. Weitere nicht angeführte Verbraucher werden durch die geringere Auslastung der genannten Komponenten in der Produktionsfermentation berücksichtigt.

Für die Berechnung der Anlagenkosten aus den Komponentenkosten wurde der für vergleichbare Anlagen übliche Faktor 3,9 benutzt [295].

Thermische und elektrische Energie werden, da die Anlage als Annexanlage konzipiert ist, durch das Kraftwerk der zugehörigen Zuckerfabrik bezogen.

Elektrische Energie wird mit 0,05 EUR/kWh [296] und thermische Energie (Dampf) mit 0,03 EUR/kWh [294] veranschlagt. Frischwasser wird ebenfalls auf dem Wasserwerk der Zuckerfabrik bezogen und mit 3,00 EUR/m³ [294] in Rechnung gestellt.

Zur Ermittlung der Kapitalkosten wird die Abschreibungsmethode herangezogen.

6.3.7 Berechnung der Herstellkosten

Die für die Auslegung grundsätzlich benötigten Anlagenteile werden in der nachfolgenden Liste zusammengestellt. Die in Abbildung 6-2 aufgeführten Apparate werden in Tabelle 6-1 aufgegriffen.

Die dabei angegebenen Abmessungen, Anzahlen und Leistungsaufnahmen bilden die Grundlage für die Berechnung der Herstellungskosten von Erythrit. Nicht berücksichtigt sind in dieser Tabelle die Kosten für den Transport des Erythrits zu einer geeigneten Lagerstätte sowie die Lagerkosten selbst. Eine Vollentsalzung ist in diesem Prozess nicht vorgesehen, da von einer direkten Kristallisation aus der Fermentationsbrühe nach Abtrennung der Biomasse und Artefakte ausgegangen wird.

Die Berechnung der Betriebskosten erfolgt mittels eines automatisierten Microsoft™ Excel™ Tabellenblattes. In diesem ist die Variation fast aller Parameter innerhalb weiter Bereiche möglich.

6 Ökonomische Betrachtungen

Tabelle 6-1 Komponentenliste für eine Produktionsanlage mit einer Jahreskapazität von 5.000 t sowie Auflistung der zugehörigen Leistungsaufnahme der Einzelkomponenten

Komponente	Dimension	Abmessung	Anzahl	Elektrische Einzelleistung [kW]	Thermische Einzelleistung [kW]	Kühlwasser [m³/h]
Tank (Impfgut)	m³	30,00	1	0,40	0	0,10
Temperierter Mischtank	m³	135,00	1	0,10	0	0
Temperierter Mischtank	m³	30,00	1	0,80	0	0
Kreiselpumpe (Impfgut)	m³/h	3,75	1	0,40	0	0
Kreiselpumpe (Saccharose)	m³/h	16,88	2	0,30	0	0
Kreiselpumpe (Zuschlag)	m³/h	7,50	1	0,80	0	0
Durchlaufsterilisator	m³/h	33,75	1	0,40	60,00	0
Fermenter	m³	150,00	7	37,50	3.000,00	7,50
Kreiselpumpe (Substrat)	m³/h	75,00	1	22,50	0	0
Verdichter	m³/h	155,13	2	560,00	0	0
Sterilfilter Zu-/Abluft	m³/h	4,50	138	0	0	0
Gaskühler	m³/min	252,00	1	0	0	50,40
Tank mit Rührwerk	m³	93,67	1	28,10	0	0
Kreiselpumpe	m³/h	3,51	1	0,30	0	0
Querstromfilter	m³/h	3,90	1	0,78	0	0
Zwischenbehälter	m³	103,00	1	0	0	0
Kolonne (Aktivkohle)	m³	15,00	1	0	0	0
Tank mit Rührwerk	m³	18,00	1	5,77	0	0
Dickstoffpumpe	m³/h	0,47	2	0,94	0	0
Kammerfilterpresse	m³/h	0,66	1	8,00	0	0
Verdampferstation	m³/h	4,81	1	5,88	0,35	1,00
Kühlungskristallisation	m³/h	1,22	1	5,00	0	6,25
Zentrifugen	m³/h	1,22	1	50,00	0	0
Trocknung/Kühlung	t/h	0,84	1	25,00	71,00	0
Zwischenbehälter (Saccharose)	m³	66,85	1	0,01	0	0
Zwischenbehälter (Zuschlag)	m³	3,12	1	0,06	0	0
Bandwaage	t/h	40,80	1	0,10	0	0
Bandförderer	t/h	40,80	1	0,20	0	0
Flurförderer	t	6,00	1	0	0	0

6 Ökonomische Betrachtungen

Tabelle 6-2 Zusammenfassung der wichtigsten Daten einer Produktionsanlage zur Herstellung von Erythrit (5.700 t/a) und Ermittlung der Herstellkosten

Jahresmenge	t/a	5.235,47	
Erythritkonzentration	g/L	215,00	
Ausbeute Fermentation	(w/w)	0,63	
Ausbeute allgemein	%	79,14	
Jahresmenge nominell	t/a	6.318,32	
Fermentationszeit	h	212,00	
Jahresverfügbarkeit	h	8.059,20	
Reaktorgröße	L	150.000,00	
Anzahl Reaktoren	-	7,00	
Anzahl Fermentationen	-	36,63	
Produktion Zielprodukt, gewünschte Menge	t/a	5.000,00	
Produktion Zielprodukt, zu produzierende Menge zur Erreichung	t/a	6.318,32	
Produktion Zielprodukt, tatsächliche Menge nach Verlusten	t/a	5.235,47	
Rohstoffkosten	Jahresmenge [t/a]	Kosten [EUR/t]	Jahreskosten [EUR/a]
Saccharosekonzentration	10.462,31	450,00	4.708.038,11
Stickstoffquelle	369,26	3.500,00	1.292.402,62
Salz 1	192,32	1.550,00	298.098,82
Salz 2	0,00	0,00	0,00
Salz 3	0,00	0,00	0,00
Salz 4	0,00	0,00	0,00
Antischaum	1,92	1.000,00	1.923,22
Flockungshilfsmittel	0,01	560	0,00
Frischwasser, real	7.884,90	3,00	23.654,70
Gesamtkosten Substrate [EUR]			6.324.117,46
Energiekosten und Hilfsmittel			
Elektrische Energie [EUR]	9.883.718,18	0,05	494.185,91
Thermische Energie [EUR]	25.628.872,09	0,03	768.866,16
Kühlwasser [EUR]	6.171.249,34	0,05	308.562,47
Hilfsmittel [EUR]			80.040,00
Summe [EUR]			1.651.654,54
Personalkosten			
Gemittelte Personalkosten [EUR]	15.580,61	30,00	467.418,31
Kapitalkosten		ohne Zuschlagfaktor	mit Zuschlagfaktor
Vorkultur [EUR]		61.137,49	238.436,23
Biokonversion [EUR]		3.744.436,17	14.603.301,06
Biomasseabscheidung [EUR]		488.657,70	1.905.765,04
Thermische Aufarbeitung [EUR]		1.561.640,14	6.090.396,54
Zusatzeinrichtungen [EUR]		133.183,15	519.414,30
Abschreibungsjahre			10,00
Instandhaltung		2,00	467.146,26
Versicherungen, Steuern		6,00	1.401.438,79

Fortsetzung auf
nächster Seite!

Jahreskosten

Verbrauchsdaten	EUR/a	8.411.847,12
Personalkosten	EUR/a	467.418,31
Kapitalkosten	EUR/a	4.204.316,37
Jahreskosten	EUR/a	13.083.581,80

Produktpreis

Jahreskosten	EUR	13.083.581,80
Produktionsmenge	t	5.235,47
Produktionskosten	EUR/t	2.499,03
Produktionskosten	EUR/kg	2,50

Es ergeben sich Herstellkosten für das Produkt Erythrit in Höhe von 2,50 EUR/kg. Im Folgenden werden die anteiligen Kosten der einzelnen Unterschritte innerhalb der einzelnen Kostengruppen aufgeschlüsselt.

6.4 Untersuchung der Herstellkosten

Die Herstellkosten ergeben sich aus der Summe der Kostengruppen Verbrauchskosten, Personalkosten und Kapitalkosten bezogen auf die jährlich hergestellte Produktmenge. Die einzelnen Kostengruppen sind wiederum unterteilt.

6.4.1 Jahreskosten

Die Jahreskosten ermitteln sich aus der Summe der Verbrauchskosten, Personalkosten und Kapitalkosten. In Abbildung 6-3 ist der relative Anteil der einzelnen Kostengruppen an den Jahreskosten abgebildet. Es zeigt sich deutlich, dass die Verbrauchskosten mit 64 % den größten Teil der Kosten stellen. Die Personalkosten sind, bedingt durch die hohe Automatisierung der Anlage und Prozessschritte, mit 3,6 % der Jahreskosten sehr niedrig. Die Kapitalkosten verursachen 32 % der Jahreskosten.

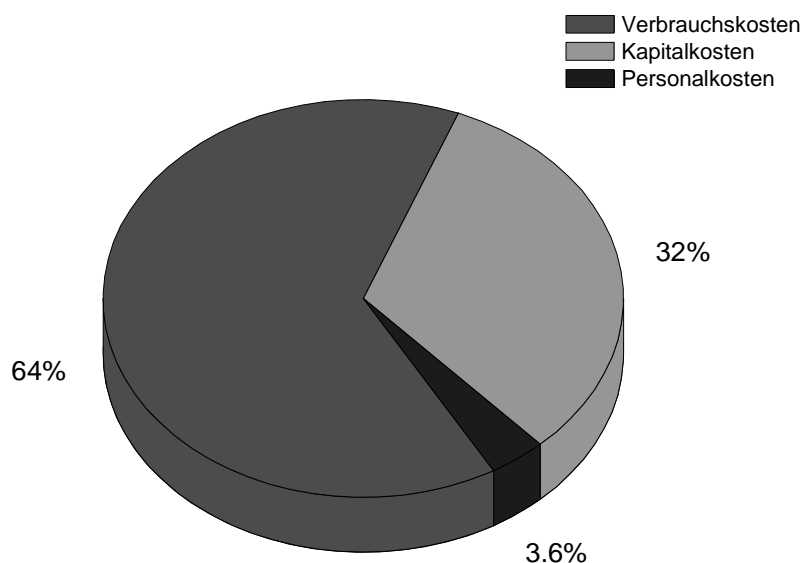


Abbildung 6-3 Relativer Anteil der Kostengruppen an den Herstellkosten

6.4.2 Verbrauchskosten

Die Verbrauchskosten setzen sich aus den Kostengruppen Rohstoffkosten und Energiekosten und Hilfsmittel zusammen. In Abbildung 6-4 ist die Zusammensetzung der Verbrauchskosten aufgeschlüsselt. Die Rohstoffe stellen mit 80 % der Verbrauchskosten den weitaus überwiegenden Teil der Kosten.

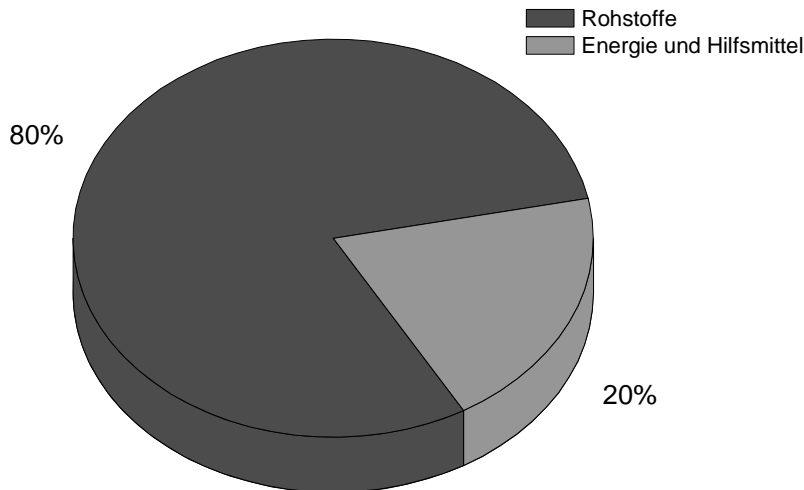


Abbildung 6-4 Anteil der Kostengruppen Rohstoffe und Energie und Hilfsmittel an den Verbrauchskosten

Die Rohstoffkosten sind die Summe aller für die Fermentation notwendigen Rohstoffe und stellen einen Unterpunkt der Verbrauchskosten dar. Das Substrat Saccharose beansprucht mit 74 % der Kosten den größten Anteil an den Rohstoffkosten. Hefeextrakt als Stickstoff-, Mineralstoff- und Vitaminquelle stellt mit 20 % der Kosten den zweitgrößten Anteil. Antischaum, KH_2PO_4 und Frischwasser zusammen erreichen knapp 5 %. Durch die Wiederverwendung von Brüden kann der Frischwasserbedarf weitgehend minimiert werden.

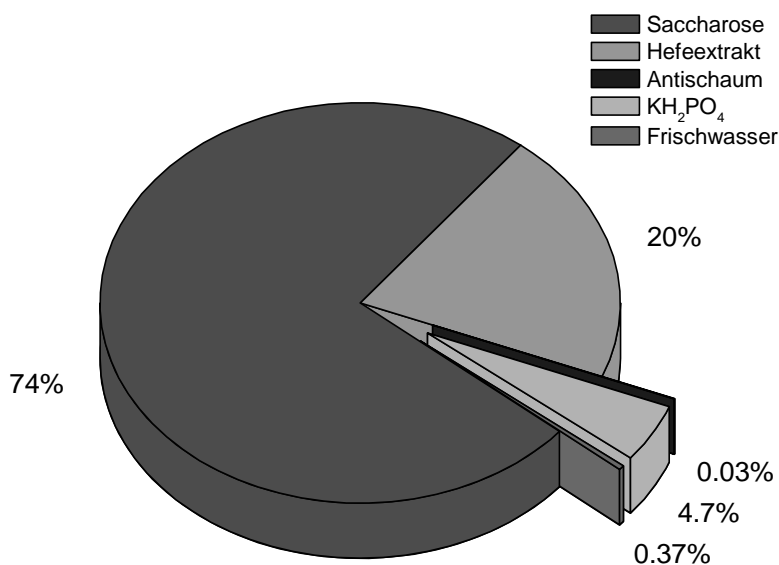


Abbildung 6-5 Relativer Anteil der einzelnen Rohstoffe an den Rohstoffkosten

Energiekosten und Hilfsmittel (z.B. Filtermaterial) sind ein Teil der Verbrauchskosten. In Abbildung 6-5 ist die Zusammensetzung dieser Kostengruppe aufgeführt. Thermische Energie in Form von Dampf, die für die Einengung, Trocknung und Sterilisation von Fermentern und Medium benötigt wird, ist für 47 % der Kosten verantwortlich, Kühlwasser zur Gaskühlung und Temperierung der Fermenter sowie elektrische Energie für Antriebe und Pumpen liegen mit 19 % bzw. 30 % etwa auf gleichem Kostenniveau. Der Kostenanteil für Hilfsmittel bezieht sich im wesentlichen auf Filtermaterial und dessen periodischen Wechsel.

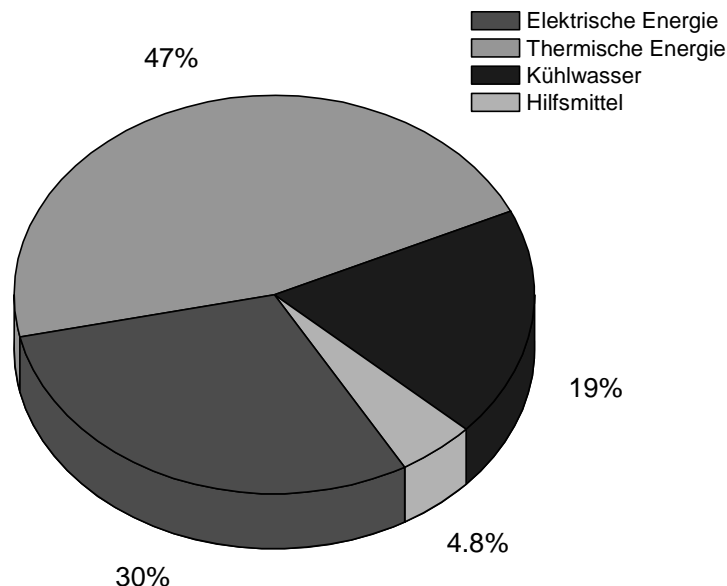


Abbildung 6-6 Relativer Anteil der einzelnen Energiearten und Hilfsmitteln an Energiekosten und Hilfsmitteln

6.4.3 Kapitalkosten

Die Kapitalkosten bestimmen sich aus den verzinnten Komponentenkosten der einzelnen Verfahrensschritte. Wie aus zu entnehmen ist, stellt die Biokonversion, also alle up-stream-Anlagen und die Fermenter, mit 60 % den größten Kostenanteil. Durch eine geschickte Verschachtelung der Vorkultur- und Produktionsfermentationszyklen ist eine Minimierung der Vorkulturfermenterkapazität möglich. Die Kosten der Vorkultur können mit 1 % der Kapitalkosten sehr niedrig gehalten werden. Die thermische Aufarbeitung des Produktes, also Einengung, Kristallisation und Trocknung, verursacht 26 % der Kosten. Die mechanische Biomasseabscheidung ist durch den Einsatz einer Querstromfiltrationsanlage mit 8,2 % Kostenanteil sehr kostengünstig. Zusatzeinrichtungen wie Bandförderer stellen mit 2,2 % den zweitkleinsten Kostenanteil.

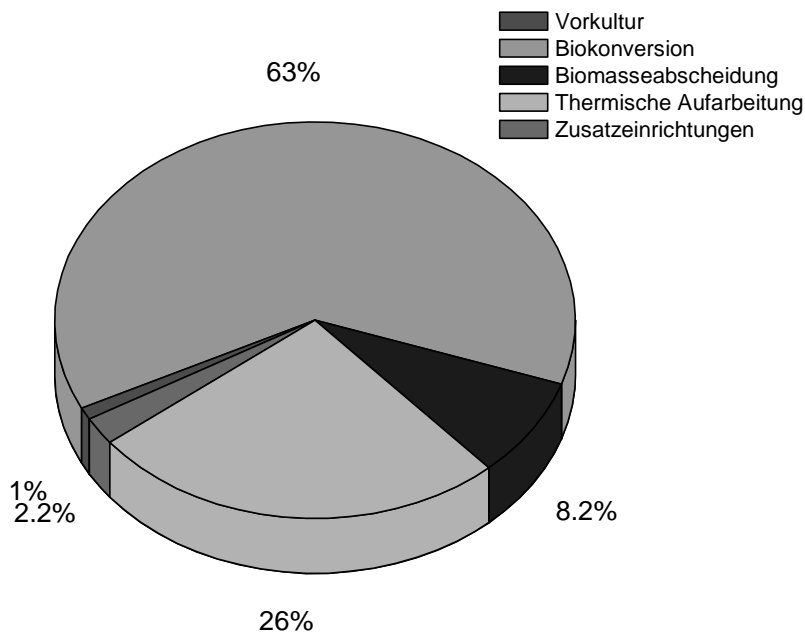


Abbildung 6-7 Relativer Anteil der einzelnen Komponentengruppen an den Kapitalkosten

6.4.4 Personalkosten

In diesem Modell zur Ermittlung der Herstellkosten wurde auf ein differenziertes Gehaltsmodell von Hilfskräften, (Fach-) Arbeitern, Meistern, Technikern, Ingenieuren und unterstützenden Kräften verzichtet, da dies eine automatisierte Berechnung der Personal unmöglich gemacht hätte. Statt dessen wurde ein durchschnittliches Jahresgehalt für einen Mitarbeiter angenommen und der Personalbedarf an den einer Anlage zur Erzeugung von Bioethanol angelehnt. Aus den hiervon bekannten Daten konnte eine entsprechende Anpassungsfunktion abgeleitet werden.

6.4.5 Sensitivitätsuntersuchung

Die Herstellkosten stehen in Abhängigkeit einer Vielzahl von Variablen, die sich auf Grund unterschiedlichster Gegebenheiten ändern können. Es wurde daher eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Variablen auf die Herstellkosten zu ermitteln. Untersucht wurden der Einfluss der Energiekosten, der Fermentergröße, der Fermentationszeit, der Rohstoffpreise (außer Frischwasser und Antischaum), der Steigerung der Ausbeute bei gleichbleibender Substratkonzentration, der Steigerung der Ausbeute bei gleichbleibender Produktkonzentration sowie die Steigerung der Produktkonzentration bei gleichbleibender Ausbeute.

Aus der in Kapitel 6.4.1 gezeigten Aufteilung der Herstellkosten geht hervor, dass die Verbrauchskosten 64 % der Herstellkosten betragen. Aus diesen Gründen stützt sich die Sensitivitätsanalyse auch ausschließlich auf diesen Kostenbereich.

Im folgenden ist in allen Diagrammen der Ausgangswert für die Berechnung mit einem Kreis markiert worden. Die Sensitivitätsanalyse bezieht sich auf die vorherige Berechnung der Herstellkosten (siehe 6.3.7).

6.4.5.1 Rohstoffpreise

Mit der Öffnung des EU-Zuckermarktes ist mit massiven Schwankungen des Preises von Saccharose zu rechnen. Da die Kosten von Saccharose 74 % der Rohstoffkosten stellen, ist bei einer Preisänderung an diesem Punkt die höchste Abweichung zu erwarten.

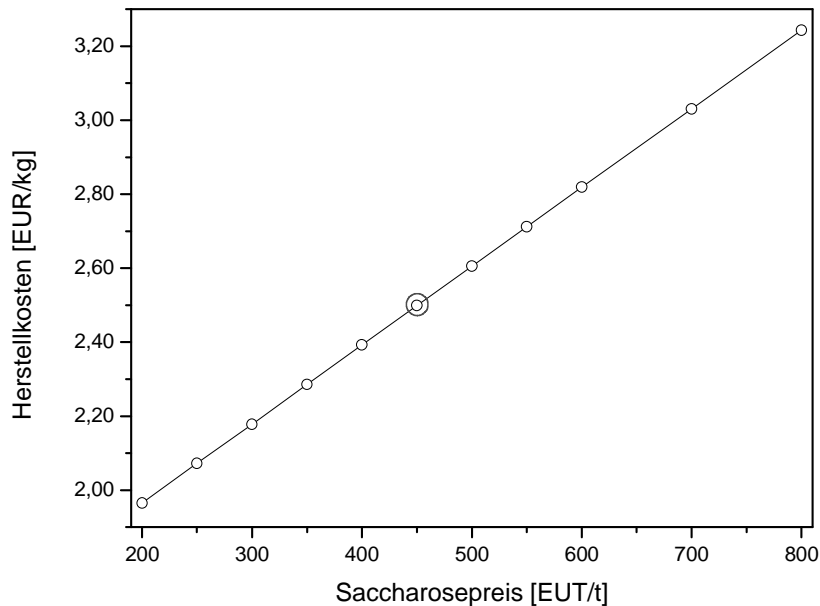


Abbildung 6-8 Einfluss des Saccharosepreises auf die Herstellkosten von Erythrit

In dieser Berechnung wurde die Verwendung von Hefeextrakt als Stickstoff-, Mineralstoff- und Vitaminquelle zu Grunde gelegt. Die Kosten von Hefeextrakt machen 20 % der Rohstoffkosten aus.

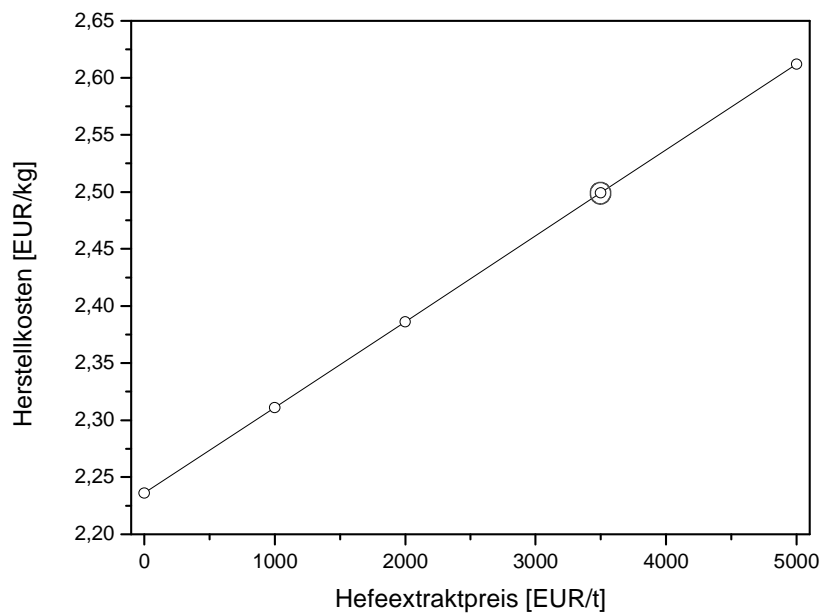


Abbildung 6-9 Einfluss des Hefeextraktpreises auf die Herstellkosten von Erythrit

Kaliumdihydrogenphosphat ist ein dem Medium zugesetztes Salz, welches für eine initiale, minimale Pufferung des pH-Wertes sorgt und Phosphor zur Vergügung stellt. Der Kaliumdihydrogenphosphatanteil an den Rohstoffkosten beträgt 4,7 %.

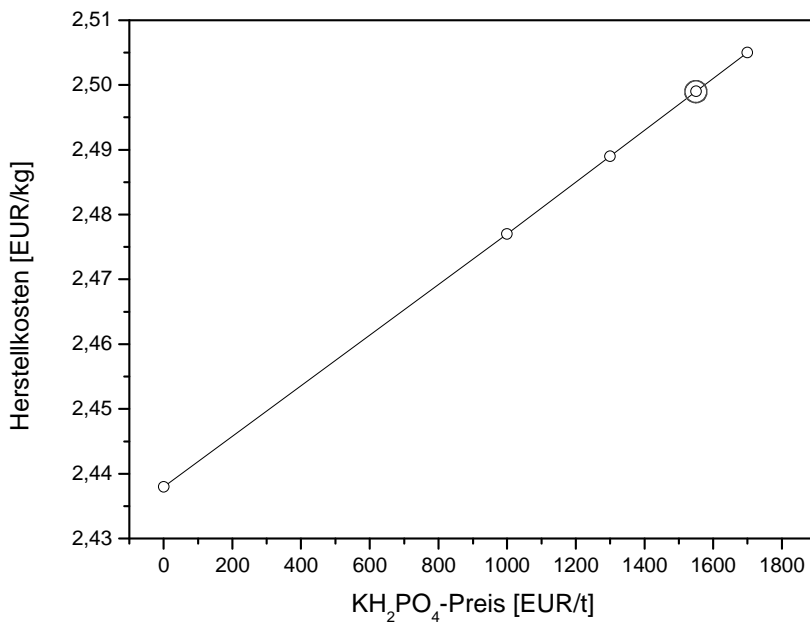


Abbildung 6-10 Einfluss des Kaliumdihydrogenphosphatpreises auf die Herstellkosten von Erythrit

6.4.5.2 Energiekosten

Die Energiekosten sind – bedingt durch die weltpolitische Lage – seit einigen Jahren einem steten, unvorhersehbaren Wandel unterworfen. Insbesondere die Preise für Erdgas, Erdöl und Kohle schwanken. Hiervon sind die Kosten für elektrische Energie und Dampf betroffen. Die Kosten für Kühlwasser sind hauptsächlich durch die zum Fördern benötigte elektrische Energie bestimmt und daher kaum variabel. Sie werden daher nicht in die Sensitivitätsanalyse mit einbezogen, obwohl sie einen Anteil von 19 % an den Kosten für Energie und Hilfsmittel tragen. Die scheinbare Nichtlinearität ist Rundungsfehlern in der Berechnung zuzuordnen.

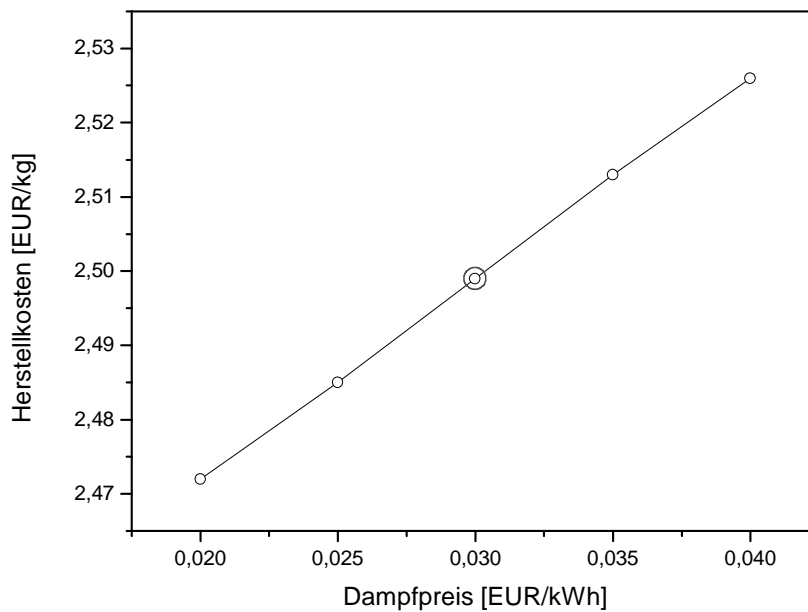


Abbildung 6-11 Einfluss des Dampfpreises auf die Herstellkosten von Erythrit

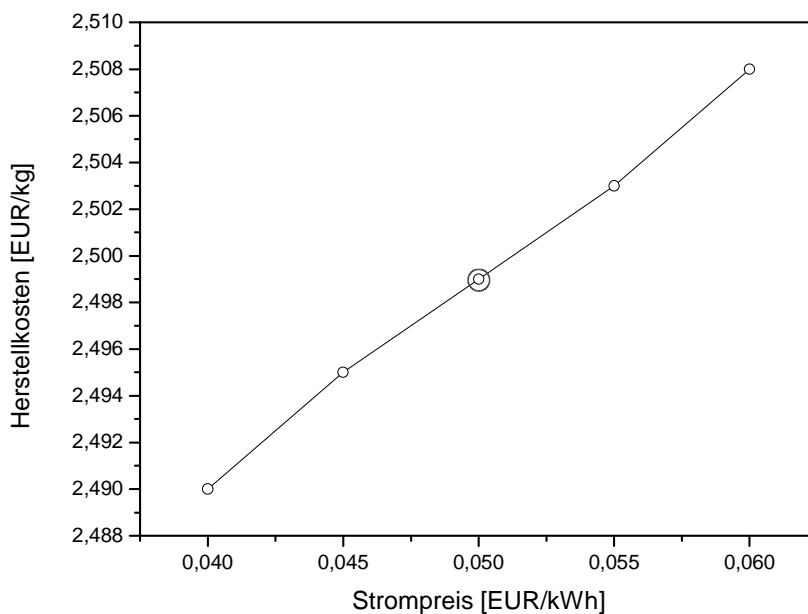


Abbildung 6-12 Einfluss des Strompreises auf die Herstellkosten von Erythrit

6.4.5.3 Fermentervolumen

Das Fermentervolumen ist für den die Biokonversion entscheidend, da direkt von der Fermentergröße die Anzahl der zu verwendenden Fermenter abhängt. Da die Kosten für Fermenter jedoch nicht linear zur Größe steigen sondern einer Preisdegression folgen, ist die Nutzung von größeren Reaktoren sehr interessant. Sehr große Reaktoren weisen jedoch häufig schlecht durchmischte Zonen auf und haben oftmals einen verzögerten Wärme- und Stofftransport.

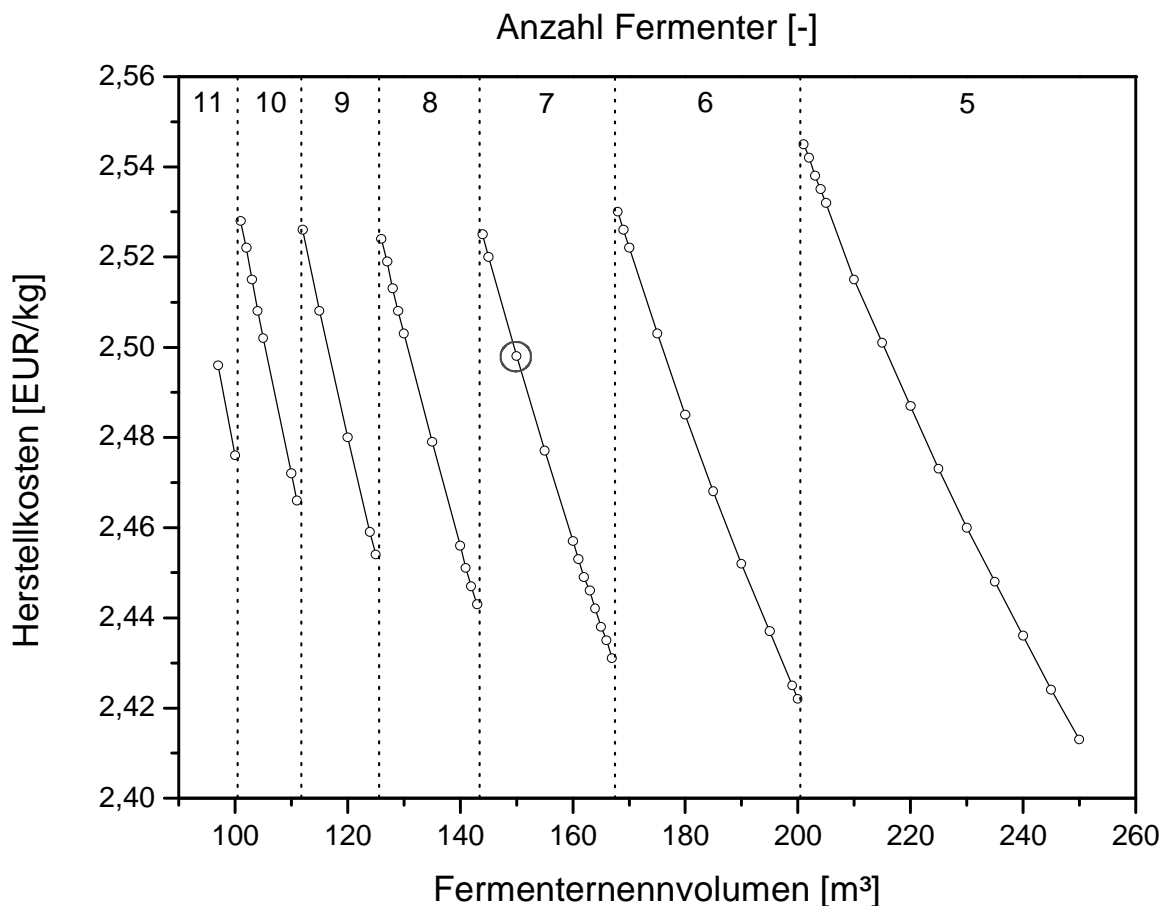


Abbildung 6-13 Einfluss des Fermentervolumens auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Anzahl der benötigten Reaktoren zur Erreichung der Mindestjahresproduktion

In Abbildung 6-13 ist der Einfluss des Fermentervolumens auf die Herstellkosten in mehreren Verläufen abgebildet. Die einzelnen Kurven geben die Herstellkosten bei Verwendung von n Fermentern mit dem entsprechenden Fermenternennvolumen wieder. Diese Sprungstellen sind die break-even-Punkte. Innerhalb des Krüvenverlaufes nimmt die maximal möglich herzustellende Menge an Produkt mit zunehmendem Fermentervolumen zu, da immer die gleiche Anzahl an Fermentern benötigt wird. Dadurch sinken die relativen Kosten für die weiteren Aufarbeitungsschritte und die relativen Kosten für den benötigten Reaktionsraum. Wird die Fermentergröße weiterhin erhöht, so dass ein Fermenter weniger benötigt wird, sinkt die maximal erzeugbare Erythritmenge wieder deutlich ab und die relativen Kosten für die Weiterverarbeitung erhöhen sich wieder.

6.4.5.4 Fermentationszeit

Die Fermentationszeit spielt für die Auslegung einer Kultivierung eine wichtige Rolle, da durch sie die Anzahl der Reaktoren bei festem Volumen bestimmt wird.

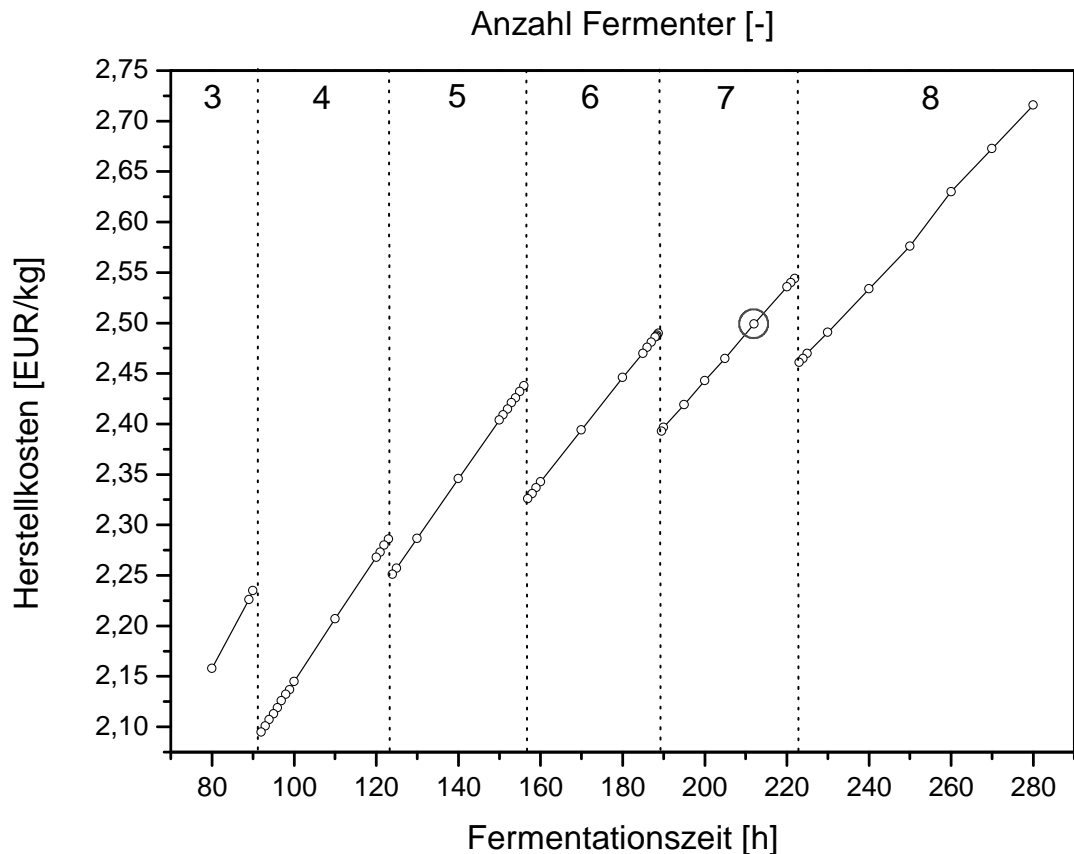


Abbildung 6-14 Einfluss der Fermentationszeit auf die Herstellkosten von Erythrit. Oben in der Abbildung die Anzahl der benötigten Reaktoren zur Erreichung der Mindestjahresproduktion

In Abbildung 6-14 ist der Einfluss der Fermentationszeit auf die Herstellkosten in mehreren Kurven abgebildet. An den Sprungstellen sind wieder die break-even-Punkte zu finden. Sinkt die Fermentationszeit innerhalb einer Kurve ab, so kann mehr Produkt in gleicher Zeit hergestellt werden, da Anzahl und Volumen der Fermenter gleich bleiben. Hierdurch sinken die relativen Kosten für die weitere Behandlung des Produktes sowie für das benötigte Reaktionsvolumen. Sinkt die Fermentationszeit über den break-even-Punkt hinaus ab, so ist ein Fermenter weniger nötig um die geforderte Jahresmindestmenge zu produzieren. Die nun maximal erzeugbare Jahresmenge ist deutlich geringer, die relativen Kosten für Weiterbearbeitung und Reaktionsvolumen steigen wieder an.

6.4.5.5 Ausbeute

Die Ausbeute stellt für einen Prozess eine wichtige Kenngröße dar und beeinflusst den Preis des Produktes direkt. Eine Veränderung der Ausbeute kann durch eine Veränderung der eingesetzten Substratmenge bei gleicher erzeugter Produktmenge oder durch eine Veränderung der Produktmenge bei gleicher eingesetzter Substratmenge erzielt werden.

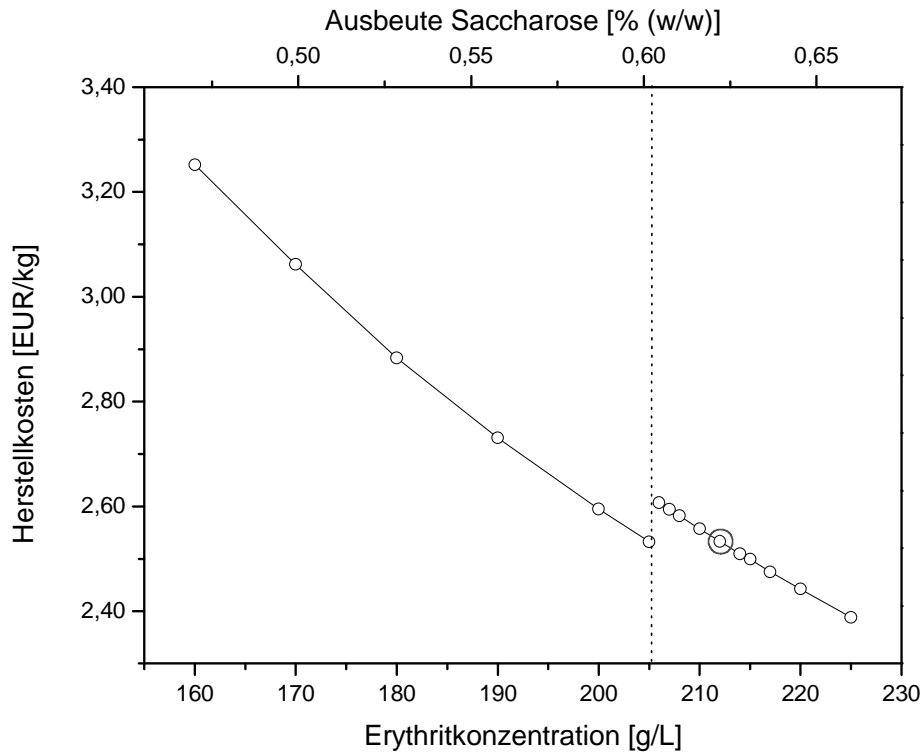


Abbildung 6-15 Auswirkung der Erythritkonzentration bei konstanter Substratkonzentration auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Produktausbeute bezogen auf Saccharose (w/w)

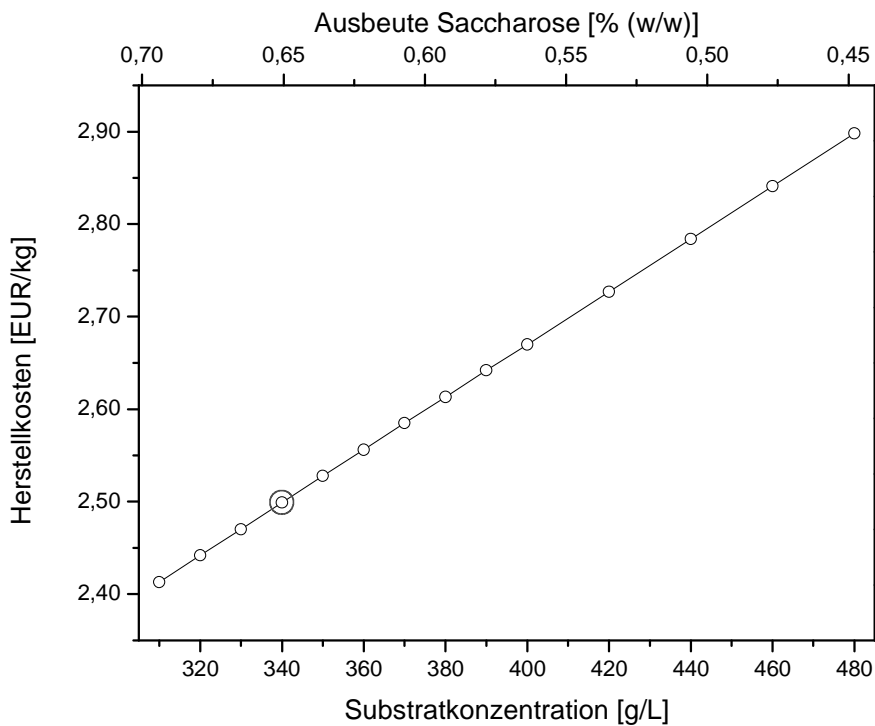


Abbildung 6-16 Auswirkung der Substratkonzentration bei konstanter Produktkonzentration auf die Herstellkosten. Oben in der Abbildung die Produktausbeute bezogen auf Saccharose (w/w)

In Abbildung 6-15 ist der Einfluss der Erythritkonzentration bei konstanter Substratkonzentration abgebildet. Mit der Erythritkonzentration verändert sich auch die Produktivität und damit die Anzahl der benötigten Fermenter. Der break-even-Punkt markiert wie schon unter 6.4.5.4 erläutert eine veränderte Anzahl an Reaktoren, die zur Erreichung der Jahresmindestproduktionsmenge notwendig sind. Setzt man eine konstante Produktkonzentration voraus und verändert die Substratkonzentration, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Preis, da sich die Produktmenge durch die Variation der Substratkonzentration nicht ändert.

6.4.5.6 Produktkonzentration bei konstanter Ausbeute

Die Veränderung der Produktkonzentration bei konstanter Ausbeute und konstanter Fermentationszeit beeinflusst den Prozess durch eine erhöhte Produktivität und damit einer Veränderung in der Anzahl der benötigten Reaktoren (siehe 6.4.5.4).

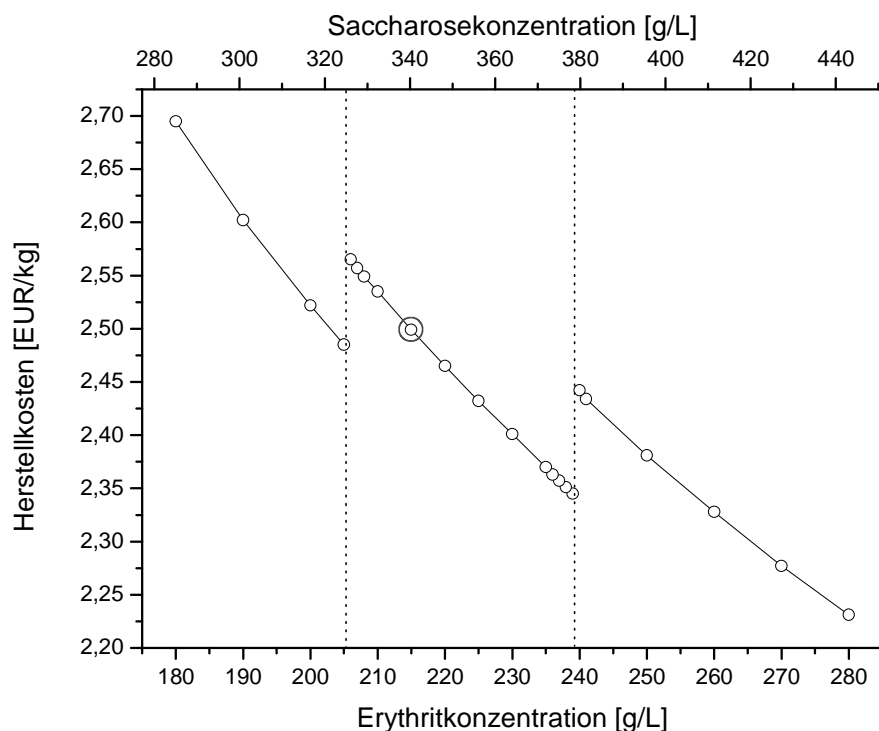


Abbildung 6-17 Auswirkung der Veränderung der Produkt- und Substratkonzentration bei konstanter Ausbeute auf die Herstellkosten von Erythrit

In Abbildung 6-17 ist die Abhängigkeit der Herstellkosten von Erythrit in Abhängigkeit der Substrat- und Produktkonzentration bei konstanter Ausbeute abgebildet. Die Sprungstellen stellen break-even-Punkte dar, an denen sich die Anzahl der benötigten Fermenter zur Erreichung der Jahresmindestproduktionsmenge ändert. Grundsätzlich geht eine Reduktion der Herstellkosten mit einer Erhöhung der Erythritkonzentration einher.

7 Zusammenfassung

7.1 Medienuntersuchung

Durch ein Screening konnte aus verschiedenen Hefeextrakten und Maisquellprodukten der Hefeextrakt der Fa. Merck als leistungsfähigster identifiziert werden. Weitere Untersuchungen mit diesem ergaben eine maximale Erythritbildung von 191 g/L bei einer Konzentration von 10 g/L und eine Erythritbildung von 175 g/L bei 15 g/L Hefeextrakt. Bei 15 g/L Hefeextrakt wurde jedoch eine nahezu doppelt so hohe Produktivität und eine deutlich höhere Ausbeute erzielt werden. Der Ersatz des organisch gebundenen Stickstoffs durch anorganischen Stickstoff ist möglich und führt zu einer weiteren Steigerung der Erythritkonzentration von bis zu 215 g/L bei einer sehr guten Ausbeute von 60,6 % (w/w) Glucoseäquivalent. Dieses Ergebnis stellt einen großen Durchbruch in Bezug auf Ausbeuteerhöhung dar.

Die Verwendung von Gülle als komplexem Medienbestandteil ist möglich. Hierbei können Erythritkonzentrationen von bis zu 155 g/L erreicht werden. Durch die starke Zunahme der Fermentationszeiten und die hierdurch sinkende Produktivität ist eine kostengünstige Herstellung von Erythrit auf dieser Basis nicht möglich.

Kartoffelrestfruchtwasser als Substrat zeigt gute Ergebnisse sowohl bei der Erythritbildung von maximal 160 g/L. Die Produktivitäten entsprechen denen von Kulturen mit Hefeextrakt, im Vergleich zu einem Medium mit Hefeextrakt und anorganischem Stickstoff werden deutlich niedrigere Ausbeuten erreicht.

Der Zusatz von Cu^{2+} -Ionen führt in geringen Konzentrationen zu einer Verbesserung der Erythritbildung. Höhere Konzentrationen bewirken eine Abnahme der Erythritbildung.

Mg^{2+} -Ionen verursachen mit zunehmender Konzentration eine Verschlechterung der Erythritbildung bei verminderter Ausbeute.

Die Gegenwart von Manganionen hat eine geringe positive Auswirkungen auf die Erythritbildung. Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ist die Erythritbildung in Gegenwart erhöht.

Bereits geringe Konzentrationen an Fe^{3+} zeigen negative Auswirkungen auf die Erythritkonzentration.

Die Erythritbildung nimmt mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration zunächst etwas zu und durchläuft dann einen Tiefpunkt. Ab einer Konzentration von 50 mg/L übt Calcium wieder einen förderlichen Effekt aus. Mit 180 g/L bei 100 mg/L Calcium werden die Ergebnisse der Referenz überschritten.

Der Zusatz von Vitamin B₁ zum Medium hat auf die gebildete Erythritmenge nur wenig Einfluss. Der Einfluss auf die Ausbeute ist jedoch deutlich zu erkennen. Die Ausbeute durchläuft einen Tiefpunkt bei 10 mg/L Vitamin B₁ und nimmt ab von dort an wieder stetig zu.

Ein Limitierung des Prozesses durch Schwefel kann ausgeschlossen werden.

Sowohl die Gabe von Sulfat als auch Cystein zusätzlich zum komplexen Medienbestandteil führt zu keinem positiven Effekt. Durch diese Medienzusätze wird die Erythritbildung sogar behindert.

Die Untersuchung der gekoppelten Produkthemmung und Substratlimitierung ergab, dass bei Saccharosekonzentrationen von 200 g/L an bei zunehmender vorliegender Erythritkonzentration die gebildete Erythritmenge abnahm. Gleichfalls nimmt mit zunehmender vorgelegter Erythritkonzentration die Ausbeute bei diesen Substratkonzentrationen merklich ab. Im Bereich niedriger Substratkonzentrationen

wurden jedoch durchgehend hohe Ausbeuten beobachtet. Aus den erhaltenen Daten konnte eine maximal erreichbare Erythritkonzentration von ca. 310 g/L ermittelt werden. Dieser Wert liegt gerade unterhalb der Löslichkeitsgrenze von Erythrit von 340 g/L bei 33 °C. In einem fed-batch Experiment wurde im niedrigen Substratbereich Saccharose zugefüttert. Hierdurch konnten Erythritkonzentrationen von bis zu 248 g/L erreicht werden.

Der Prozess ist mit den verwendeten Substraten nicht phosphatlimitiert. Die Beimischung von Phosphat zum Produktionsmedium nimmt eine sehr geringe Pufferaufgabe wahr. Für eine großmaßstäbliche Herstellung von Erythrit kann auf die Verwendung von Phosphat verzichtet werden, da Phosphat im Rahmen der Produktaufreinigung durch Ionentauscher entfernt werden muss. Dies verursacht zusätzliche Kosten, die einfach vermieden werden können.

Der Einfluss der Metallionen Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} und Ca^{2+} auf das Produktbildungsverhalten wurde untersucht. Cu^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} haben in Konzentrationen von 1 mg/L einen leicht positiven Effekt auf die gebildete Erythritmenge. Die Gegenwart von Mg^{2+} und Fe^{3+} stört in jeder Konzentration den Metabolismus des Pilzes und führt zur einer Verminderung der Erythritmenge. Der Einfluss von Vitamin B1 auf die Erythritbildung ist kaum ausgeprägt.

Für den Metaboliten Ribit wurde gezeigt, dass bereits geringe Konzentrationen ab 1 g/L zu deutlichen Einbußen bei der Erythritkonzentration und -ausbeute führen. Bei einem zukünftigen industriellen Prozess sollte daher die Bildung von Ribit unterdrückt werden.

Glycerin hat in Konzentrationen von bis zu 100 g/L keine Auswirkungen auf das Produktbildungsverhalten. Für eine industrielle Produktion ist die Gegenwart von Glycerin somit nicht von Bedeutung. Das Unterbinden einer Glycerinbildung ist jedoch wünschenswert, da durch die Glycerinbildung während der Fermentation die Ausbeute an Erythrit gesenkt und die Aufarbeitung erschwert wird.

Ethanol als Mediumsbestandteil beeinflusst die Erythritbildung positiv. Bis zu einer Konzentration von 20 g/L zeigt die erreichte Erythritkonzentration einen leichten Aufwärtstrend bei nahezu unveränderter Ausbeute. Für einen zukünftigen technischen Prozess ist dies von erheblichem Interesse, da für einen fed-batch-Prozess Ethanol zur Zufütterung billig verfügbar ist.

7.2 Einfluss physiko-chemischer Parameter sowie Schaumbekämpfung

Der Einfluss des initialen pH-Wertes wies im Bereich pH 5-7 nur geringe Auswirkungen auf die Kultivierung auf. Eine weitere Absenkung des initialen pH-Wertes führte zu einer deutlichen Verminderung der Erythritkonzentration.

Der Sauerstoffpartialdruck stellt einen wichtigen Einflussfaktor für die Produktbildung dar. In Abwesenheit von Sauerstoff wird kein Erythrit, dafür aber vermehrt Glycerin und Ethanol gebildet. Der Sauerstoffeintrag durch Schüttelkolben ohne Schikanen ist zu gering für eine Erythritbildung in hoher Konzentration. Die Messung des Sauerstoffpartialdrucks in Schüttelkolben ergab einen optimalen Sauerstoffpartialdruck von 5 %. Durch eine entsprechende Regelung konnte dieser in Fermentern konstant gehalten werden. Die Kultivierung bei einem Sauerstoffpartialdruck von 15 % führte zu einer Verschlechterung der Erythritbildung. Durch die Entwicklung und den Einsatz eines Schaumberegners konnte die Schaumbildung wirkungsvoll vermindert werden.

Die im Schüttelkolbenversuch gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass nach sehr kurzer Fermentationsdauer der Sauerstoffpartialdruck auf ein Minimum absinkt und

dort für den Hauptteil der Fermentation verbleibt. Dies legt nahe, dass die Erythritproduktion an ein einen Sauerstoffpartialdruck von etwa 5 % gebunden ist. Mit Hilfe der Fermenter-Steuerungssoftware wurde eine mehrfach kaskadierte, dynamische Steuerung der Belüftungsrate implementiert. Diese erlaubt es, den Sauerstoffpartialdruck innerhalb vorgegebener Toleranzgrenzen zu halten und so die Wachstumsbedingungen den Anforderungen des Pilzes anzunähern. Ein Sauerstoffpartialdruck von 5 % konnte in den Fermentern realisiert werden. In wieweit der Sauerstoffpartialdruck weiter zu optimieren ist, muss in weiteren Fermentationen überprüft werden.

Unter Einsatz dieser Neuerungen wurden die Fermentationsleistungen für den Rührbetrieb deutlich verbessert. Es ergaben sich daraus neue Erkenntnisse für die Prozessführung für den Pilz SZ 101. Die besonders im 5,5-L Master-Fermenter auftretende Schaumproblematik wurde mittels einer Kombination von chemischer und mechanischer Schaumbekämpfung erfolgreich kontrolliert. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Schaumberechner stellt dabei eine neuartige und kostengünstige Schaumbekämpfungsmethode dar, die ohne Modifizierung des eigentlichen Fermenters eingesetzt werden kann.

7.3 Einfluss der Fermentergeometrie

Durch die Verwendung von Fermentern mit einem Umwurfeinsatz konnte die Schaumentstehung während der Kultivierung vermindert und damit die Prozessstabilität erhöht werden. Die Verwendung eines Fermenters mit einem größeren Höhe-Breite Verhältnis führt zu einer erhöhten Verweilzeit der Gasblasen und verbessert dadurch den Stofftransport. Der Sauerstoffeintrag kann dadurch erhöht und der Sauerstoffpartialdruck besser kontrolliert werden.

Im Satelliten-Fermenter wurden zumeist höhere Erythritkonzentrationen und -ausbeuten bei ansonst vergleichbaren Bedingungen festgestellt. Die Geometrie des 1,5-L Satelliten-Fermenters ist in Bezug auf die Schaumbildung der des Master-Fermenters (großes Höhe/Durchmesser-Verhältnis) deutlich überlegen. Des Weiteren wurden Fermentationen im Umwurfbetrieb etabliert. Diese lieferten mit 175,9 g/L für den Master- und 189,2 g/L für den Master-Fermenter die bisher höchsten Erythritkonzentrationen in diesem Fermentersystem.

7.4 Immobilisierung

Die Immobilisierung von SZ 101 wurde in Calcium-Alginat Vollkugeln und In LentiKats untersucht. Es zeigte sich, dass bei beiden Immobilisierungsverfahren die Biomasse aus den Immobilisaten auswuchs. Die Produktbildung erfolgte somit zeitgleich in den Immobilisaten und in der freien Biomasse im Fermentationsmedium. Die Fermentation von LentiKats wies ein signifikant schlechteres Ergebnis auf als auch die Kultivierungen im Schüttelkolben. Es wurde eine Erythritkonzentration von 41 g/L bei einer Ausbeute von 14 % erreicht. Die Glycerinkonzentration lag mit 40 g/L knapp unterhalb der Erythritkonzentration. Eine simultane Produktion von Erythrit und Glycerin ist auf Grund der schlechten Ausbeuten sowohl für Erythrit als für Glycerin nicht sinnvoll. Die Anforderungen an die Regelung des Sauerstoffpartialdruckes sind für die freie Biomasse und die immobilisierte Biomasse so unterschiedlich, dass beide Bedingungen nicht zu vereinen sind.

Der Einfluss der Biomassebeladung der Calcium-Alginat-Kugeln ergab ein Optimum von 2 % Biomasse für die Erythritbildung und 5 % für die Glycerinbildung. Auch hier tritt das Problem der unterschiedlichen Anforderungen an den Sauerstoffpartialdruck

von freier Biomasse und immobilisierter Biomasse auf. Wie bei der Kultivierung von LentiKats® kann der Sauerstoffpartialdruck nicht auf einen für beide Bereiche optimalen Wert eingestellt werden.

Die Kultivierung der Immobilisate ergab, dass es keinen Sauerstoffpartialdruck geben wird, bei dem die Anforderungen der immobilisierten Biomasse und der freien Biomasse zu gleichen Anteilen so erfüllt werden, dass eine wirtschaftlich sinnvolle Produktion von Erythrit zu bewerkstelligen ist.

7.5 Ökonomische Betrachtungen

Es wurde ein Anlagenkonzept für eine Produktionsanlage mit einer Jahresmindestkapazität von 5.000 t erstellt. Auf Grundlage dieser Daten wurden die Herstellkosten von Erythrit zu 2,50 EUR ermittelt.

Eine Sensitivitätsanalyse ergab, dass die Verbrauchskosten zu 80 % aus Substraten und zu 20 % aus Energiekosten ergeben. Bei den Substratkosten stellen mit 74 % Saccharose und 20 % Hefeextrakt den weitaus größten Teil der Kosten. Eine Verbesserung in diesen Punkten führt zu einer deutlichen Kostensenkung. Bei Untersuchungen zum Einfluss von Fermentergröße, Fermentationszeit, Erhöhung der Ausbeute durch erhöhte Erythritkonzentration konnten verschiedene break-even-Punkte ermittelt werden. Diese spielen für die Auslegung einer Anlage eine wesentliche Rolle.

Die Personalkosten spielen mit etwa 4 % der Herstellungskosten eine untergeordnete Rolle.

8 Anhang

8.1 Geräte

8.1.1 Analytik

In der Analytik verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Leco 250, SARTORIUS, Göttingen
pH-Meter	pH 526, WTW, Weilheim
Oximeter	Oxi 191, WTW, Weilheim
Schreiber	PM 8262, Xt recorder, PHILIPS, NL

8.1.2 Mikrobiologische Arbeiten

Für mikrobiologische Arbeiten verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav	Autoklavi SPA, FEDEGARI AUTOKLAVI, Albuzzano, Italien
Becherzentrifuge	BHG ZK 630, HERMLE, Gosheim
Cleanbench	Herasafe HS 12, HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Tischautoklav	SanoCLAV La S-131, Typ S-EST, WOLF, Geislingen
Tischautoklav	2450EL, TUTTNAUER, USA
Tischzentrifuge	5417R, EPPENDORF, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss Axioplan, ZEISS, Oberkochen

8.1.3 Sonstige

Sonstige verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Kühlkammer (-20 °C)	VIESSMANN, Hof
Kühlkammer (-80 °C)	VIESSMANN, Hof
Magnetrührer	IKA-Combimag Reo, IKA LABORTECHNIK, Staufen
Pumpe	502S, WATSON-MARLOW, Faulmouth, England
Thermostat	F30, Ultratemp 2000, JULABO, Seelbach
Thermostat	F34, JULABO, Seelbach
Trockenschrank	MEMMERT, Schwabach
Waage	Kern EW3000-2M, GOTT. KERN & SOHN,
Balingen	

8.2 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt wurden Chemikalien in Analysenqualität der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Substanz	Hersteller / Best.-Nr. / Charge
Ammoniummolybdat	SIGMA, Deisenhofen
Carbolfuchsin	FLUKA, Neu-Ulm
Erythrit, technisch	SÜDZUCKER, Mannheim/Ochsenfurt
Ethanol, Rotipuran	ROTH, Karlsruhe # 9065
Glycerin, Pharmaqualität	ÖLMÜHLE, Leer
Hefeextrakt, granuliert	MERCK, Darmstadt # 3753 / 1.03753.0500
Hefeextrakt, Pulver	HARTGE INGREDIENTS, Hamburg
Hefeextrakt, Paste	MARCOR, Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	FLUKA, Neu-Ulm # 60220
Kartoffelrestfruchtwasser	AGRANA, Wien, Österreich
Ribit (Adonit), 99%	SIGMA, St. Louis, USA # A5502
Rindergülle	FAL, Braunschweig
Saccharose, technisch	SÜDZUCKER, Mannheim/Ochsenfurt
Schwefelsäure, 0,5 M	Fixanal, RIEDEL-DE-HAEN, Hannover # 38294
Struktol SB 2321	SCHILL & SEILACHER, Hamburg # 504 1269
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	RIEDEL-DE-HAEN, Hannover

8.3 Software

Verwendete Software

Software	Hersteller
Word 2000	MICROSOFT, Redwood, USA
Excel 2000	MICROSOFT, Redwood, USA
Origin 6.0	MICROCAL, Northampton, USA
Reference Manager 10	ISI RESEARCHSOFT, Philadelphia, USA
Class LC10, Vers. 1.60	SHIMADZU, Japan
ISIS Draw 2.4	MDL Information Systems, USA

8.4 Sonstige

Sonstiges verwendetes Material.

Verbrauchsmaterial	Hersteller / Best.-Nr.
pH-Teststreifen pH 0,0 – 6,0	MACHERY-NAGEL (#921 15)
pH-Teststreifen pH 2,0 – 9,0	MACHERY-NAGEL (#921 18)

8.5 Programmierung

Im Folgenden sind die kompletten Skripte zur Fermentationssteuerung des Master- und des Satelliten-Fermenters aufgeführt.

Skript für Master-Fermenter, Endfassung

Anmerkungen

#0, Definitionen, 2	#{Sequenz}, {Name}, {Zeitintervall}
limits(0,0,700,1100,1200,Stirrer)	hier werden die Grenzen zur Ausgabe
limits(32.0,32.5,33.0,33.5,34.0,Temp)	von Alarmen für die einzelnen
limits(3.39,3.49,3.69,3.79,3.89,pH)	Parameter festgelegt.
limits(0,0,5,100,100,pO2)	
limits(0,0,0,2.1,2.2,Mass Flow)	
Stirrer.ct=ON	hiermit wird die Steuerung der auf-
Temp.ct=ON	geführten Parameter auf die IRIS-
pH.ct=ON	Software gelegt.
pO2.ct=ON	
AF Pump.ct=ON	
Mass Flow.sp=0.05	hier werden den verwendeten
Mass Flow.bv=0.05	Variablen die Startwerte zu-
Stirrer.bv=500	gewiesen.
SEQ=1	Befehl zum Wechsel zu Sequenz #1.
	Sequenz #0 wird nur einmal
	durchlaufen.
#1, pO2-Control, 2	
if(pO2.v<5.5){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.02}	Funktion wie unter (4.6.3)
if(pO2.v<1.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.10}	beschrieben.
if(pO2.v>=5.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp-0.06}	
if((pO2.bv-pO2.v)<0){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}	
pO2.bv=pO2.v	
if(Mass Flow.sp<Mass Flow.bv){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}	Achtung: geändert,
if(Mass Flow.sp>1.5){Mass Flow.sp=1.5}	um dynamische Mindestbegasung
	zu implementieren.
if(Mass Flow.sp>=0.70){Stirrer.bv=Stirrer.bv+10}	
if(Stirrer.bv>1000){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv+0.02}	
if(Stirrer.bv>1000){Stirrer.bv=500}	
if(Mass Flow.sp<=Mass Flow.bv){Stirrer.bv=Stirrer.bv-1}	
if(Stirrer.bv<1){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}	
if(Stirrer.bv<1){Stirrer.bv=500}	
if(pO2.v>30){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}	
if(Mass Flow.bv<0.05){Mass Flow.bv=0.05}	
if(Mass Flow.bv>1.5){Mass Flow.bv=1.5}	
AF Pump.sp=0	Schaltet die Antischaum-
	Dosierungspumpe aus.
if(seq_time>=time(0:55)){stirrer.sp=900}	Schaltet die Rührerleistung
if(seq_time>=time(0:58)){stirrer.sp=700}	im 60-Minuten-Intervall für
if(seq_time>=time(1:55)){stirrer.sp=900}	3 Minuten auf höhere
if(seq_time>=time(1:58)){stirrer.sp=700}	Leistung.
if(seq_time>=time(2:00)){SEQ=2}	Schaltet im 2 h-Intervall

| zur Schaumbekämpfungsmittel-
| Dossage zur Sequenz #2.

#2, AF-Dosierung, 2

```

if(pO2.v<5.5){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.02}
if(pO2.v<1.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.10}
if(pO2.v>=5.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp-0.06}
if((pO2.bv-pO2.v)<0){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}
pO2.bv=pO2.v
if(Mass Flow.sp<Mass Flow.bv){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}
if(Mass Flow.sp>1.5){Mass Flow.sp=1.5}

if(Mass Flow.sp>=0.70){Stirrer.bv=Stirrer.bv+10}
if(Stirrer.bv>1000){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv+0.02}
if(Stirrer.bv>1000){Stirrer.bv=500}
if(Mass Flow.sp<=Mass Flow.bv){Stirrer.bv=Stirrer.bv-1}
if(Stirrer.bv<1){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Stirrer.bv<1){Stirrer.bv=500}

if(pO2.v>30){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Mass Flow.bv<0.05){Mass Flow.bv=0.05}
if(Mass Flow.bv>1.5){Mass Flow.bv=1.5}

```

| Kontrolle des Sauerstoff-
| partialdrucks wird auch
| während der Schaum-
| bekämpfungsmitteldossage
| fortgeführt.

AF Pump.sp=1

| Schaltet die Antischaum-
| dosierungspumpe ein.

if(seq_time>=20){SEQ=1}

| Schaltet nach 20 Sekunden
| zurück zur Sequenz #1.

Skript für Satelliten-Fermenter, Endfassung

Anmerkungen

#0, Definitionen, 2

| #{Sequenz}, {Name}, {Zeitintervall}

```

limits(0,0,623,1100,1200,Stirrer)
limits(32.0,32.5,33.0,33.5,34.0,Temp)
limits(3.30,3.49,3.50,3.60,3.70,pH)
limits(0,0,5,100,100,pO2)
limits(0,0,0,1.6,1.7,Mass Flow)

```

| hier werden die Grenzen zur Ausgabe
| von Alarmen für die einzelnen
| Parameter festgelegt.

```

Stirrer.ct=ON
Temp.ct=ON
pH.ct=ON
pO2.ct=ON
AF Pump.ct=ON

```

| hiermit wird die Steuerung der auf-
| geführten Parameter auf die IRIS-
| Software gelegt.

```

Mass Flow.sp=0.05
Mass Flow.bv=0.05
Stirrer.bv=500

```

| hier werden den verwendeten
| Variablen die Startwerte zu-
| gewiesen.

SEQ=1

| Befehl zum Wechsel zu Sequenz #1.

| Sequenz #0 wird nur einmal
| durchlaufen.
#1, pO2-Control, 2

```
if(pO2.v<5.5){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.02}      | Funktion wie unter (4.6.3)
if(pO2.v<1.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.10}      | beschrieben.
if(pO2.v>=5.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp-0.06}      |
if((pO2.bv-pO2.v)<0){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}      |
pO2.bv=pO2.v                                          |
if(Mass Flow.sp<Mass Flow.bv){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv} | Achtung: geändert,
if(Mass Flow.sp>1.5){Mass Flow.sp=1.5}              | um dynamische Mindestbegasung
                                                    | zu implementieren.

if(Mass Flow.sp>=0.70){Stirrer.bv=Stirrer.bv+10}
if(Stirrer.bv>1000){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv+0.02}
if(Stirrer.bv>1000){Stirrer.bv=500}
if(Mass Flow.sp<=Mass Flow.bv){Stirrer.bv=Stirrer.bv-1}
if(Stirrer.bv<1){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Stirrer.bv<1){Stirrer.bv=500}

if(pO2.v>30){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Mass Flow.bv<0.05){Mass Flow.bv=0.05}
if(Mass Flow.bv>1.5){Mass Flow.bv=1.5}
```

AF Pump.sp=0 | Schaltet die Antischaum-
| Dosierungspumpe aus.

If(seq_time>=time(2:00)){SEQ=2} | Schaltet im 2 h Intervall
| zur Schaumbekämpfungsmittel-
| Dossage zur Sequenz #2.

#2, AF-Dosierung, 2

```
if(pO2.v<5.5){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.02}      | Kontrolle des Sauerstoff-
if(pO2.v<1.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.10}      | partialdrucks wird auch
if(pO2.v>=5.0){Mass Flow.sp=Mass Flow.sp-0.06}      | während der Schaum-
if((pO2.bv-pO2.v)<0){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}      | bekämpfungsmitteldossage
pO2.bv=pO2.v                                          | fortgeführt.
if(Mass Flow.sp<Mass Flow.bv){Mass Flow.sp=Mass Flow.bv}
if(Mass Flow.sp>1.5){Mass Flow.sp=1.5}

if(Mass Flow.sp>=0.70){Stirrer.bv=Stirrer.bv+10}
if(Stirrer.bv>1000){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv+0.02}
if(Stirrer.bv>1000){Stirrer.bv=500}
if(Mass Flow.sp<=Mass Flow.bv){Stirrer.bv=Stirrer.bv-1}
if(Stirrer.bv<1){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Stirrer.bv<1){Stirrer.bv=500}

if(pO2.v>30){Mass Flow.bv=Mass Flow.bv-0.05}
if(Mass Flow.bv<0.05){Mass Flow.bv=0.05}
if(Mass Flow.bv>1.5){Mass Flow.bv=1.5}
```

AF Pump.sp=1

| Schaltet die Antischaum-
| dosierungspumpe ein.

if(seq_time>=20){SEQ=1}

| Schaltet nach 20 Sekunden
| zurück zur Sequenz #

9 Literaturliste

- [1] *Bippes, M.*: Mikrobielle Herstellung von Erythrit mit freien und immobilisierten Zellen. (2001), S. 1-85. Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- [2] *Falbe, J. and M. Regitz*: CD Römpp - 9. erweiterte Auflage des Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0. Thieme, 1995
- [3] *Huneck, S., G. Follmann, W. A. Weber and G. Trotet*: Über die Inhaltsstoffe einiger *Roccella*-Arten. Z.Naturforschg. 22 (1967), S. 671-673.
- [4] *Huneck, S. and G. Follmann*: Lichen component. 48. Componentes of *Combea mollusca*, *Roccella vicentina*, *Roccella gayana* and *Roccella focoides*. Z.Naturforschg. 22 (1967), S. 1369-1370.
- [5] *Bamberger, M. and A. Landsiedl*: Erythrit in *Trentepohlia jolithus*. Mh.Chem. 21 (1900) H. 6, S. 571-573.
- [6] *Lamy, M. A.*: Mémoire sur deux composés organiques nouveaux. Ann.Chim.Phys. 3 (1852) H. 35, S. 129-144.
- [7] *Shindou, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara and T. Ichikawa*: Identification of erythritol by HPLC and GC-MS and quantitative measurement in pulps of various fruits. J.Agric.Food Chem. (1989) H. 37, S. 1474-1476.
- [8] *Yoshida, H., T. Sugahara and J. Hayashi*: Studies on free sugars, free sugar-alcohols and organic-acids of edible mushrooms. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 29 (1982) H. 8, S. 451-459.
- [9] *Yoshida, H., T. Sugahara and J. Hayashi*: Studies on free sugars and free sugaralcohols of mushrooms. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 31 (1984) H. 12, S. 765-771.
- [10] *Masuda, Y., S. Sasaki, K. Yamashita, K. Hattori and Y. Ito*: Sugar composition of sake. II. Variation in sugar and sugar alcohol compositions during brewing and storage of sake. Nippon Jozo Kyokai Zasshi 62 (1967) , S. 1242-1244.
- [11] *Onishi, H. and N. Saito*: Polyols in sake. Hakko Kogaku Zasshi 38 (1960), S. 536-538.
- [12] *Dubernet, M. O., A. Bertrand and P. Ribéreau-Gayon*: Consistent presence of erythritol, arabitol and mannitol in wine. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences Serie D 279 (1974) H. 18, S. 1561-1564.
- [13] *Sponholz, W. R. and H. H. Dittrich*: Alditols and myoinositol in wines and sherries. Vitis 24 (1985) H. 2, S. 97-105.

- [14] *Onishi, H. and S. Saito*: Polyols in soysauce. *Hakko Kogaku Zasshi* 37 (1959), S. 457-461.
- [15] *Shindou, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara and T. Ichikawa*: Determination of erythritol in fermented foods by high performance liquid chromatography. *Shokuhin-eiseigaku-zasshi Nihon-shokuhin-eisei-gakkai* 29 (1988) H. 6, S. 419-422.
- [16] *Shindou, T. and H. Ishizuka*: Quantitative determination of erythritol from various natural cheeses by HPLC. *Food Sci. Technol., Int.* 2 (1996) H. 2, S. 82-83.
- [17] *Ahluwalia, B. S. and E. F. Graham*: Free carbohydrates in seminal plasma and sperm cells of semen of fowl. *J.Reprod.Fertil.* 12 (1966) H. 2, S. 359-361.
- [18] *Clark, J. B. K., E. F. Grahma, B. A. Lewis and F. Smith*: D-mannitol, erythritol and glycerol in bovine semen. *J.Soil Sci.* 13 (1967), S. 189-197.
- [19] *Storset, P., O. Stokke and E. Jellum*: Monosaccharides and Monosaccharide Derivatives in Human Seminal Plasma. *Journal of Chromatography* 145 (1978) H. 3, S. 351-357.
- [20] *Haga, H., T. Imanari, Z. Tamura and A. Momose*: Gas chromatography and its combination with mass spectrometry of urinary sugar alcohols. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* 20 (1972) H. 8, S. 1805-1808.
- [21] *Imanari, T., I. Matsunaga, K. Miura and Z. Tamura*: Urinary excretion of sugar alcohols in man. *Rinsho Kagaku* 4 (1975), S. 220-224.
- [22] *Servo, C., J. Palo and E. Pitkänen*: Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of polyols in human cerebrospinal fluid and plasma. *Acta Neurologica Scandinavica* 56 (1977) H. 2, S. 104-110.
- [23] *Britton, H. G.*: Erythritol in foetal sheep blood - site of formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 148 (1967) H. 3, S. 801-802.
- [24] *Roboz, J., D. C. Kappatos, J. Greaves and J. F. Holland*: Determination of polyols in serum by selected ion monitoring. *Clinical Chemistry* 30 (1984) H. 10, S. 1611-1615.
- [25] *Tomana, M., J. T. Prchal, L. C. Garner, H. W. Skalka and S. A. Barker*: Gas-chromatographic analysis of lens monosaccharides. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 103 (1984) H. 1, S. 137-142.
- [26] *Roberts, G. P., A. Mcdiarmid and P. Gleed*: Presence of erythritol in fetal fluids of fallow deer (*Dama dama*). *Research in Veterinary Science* 20 (1976) H. 3, S. 254-256.
- [27] *Goossens, J. F. V. and M. H. A. Gonze*: Erythritol. *The Manufacturing Confectioner* 10 (2000), S. 71-75.
- [28] *Jesus, A. J. L., L. I. N. Tome, M. T. S. Rosado, M. L. P. Leitao and J. S. Redinha*: Conformational study of erythritol and threitol in the gas state by

- density functional theory calculations. Carbohydrate Research 340 (2005) H. 2, S. 283-291.
- [29] *Howard, E. and J. R. Grigera*: Conformations of erythritol and L-threitol in aqueous solution in relation to sweetness properties - a molecular dynamics simulation. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions 88 (1992) H. 3, S. 437-441.
- [30] *Rozenberg, M., A. Loewenschuss and Y. Marcus*: IR spectra and hydrogen bonding in tetritols. Carbohydrate Research 394 (1997), S. 183-186.
- [31] *Bekoe, A. and H. M. Powell*: Crystal structure of i-erythritol and its relationship to some derived D and L and racemic substances. Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences 250 (1959) H. 1262, S. 301-315.
- [32] *Shimada, A.*: Crystal structure and lattice energy of i-erythritol. I. Crystal and molecular structure of meso-erythritol. Acta Crystallographia 32 (1959) H. 4, S. 325-329.
- [33] *Ceccarelli, C., G. A. Jeffrey and R. K. McMullan*: A neutron diffraction refinement of the crystal structure of erythritol at 22.6K. Acta Crystallographica Section B-Structural Science 36 (1980) H. DEC, S. 3079-3083.
- [34] *Shimada, A.*: Crystal structure and lattice energy of i-erythritol. II. Lattice and hydrogen bond energies for i-erythritol. Bulletin of the Chemical Society of Japan 32 (1959) H. 4, S. 330-333.
- [35] *Talja, R. A. and Y. H. Roos*: Phase and transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. Thermochimica Acta 380 (2001) H. 2, S. 109-121.
- [36] *Cooke, S. A., O. Jonsdottir and P. Westh*: The vapour pressure of water as a function of solute concentration above aqueous solutions of fructose, sucrose, raffinose, erythritol, xylitol, and sorbitol. Journal of Chemical Thermodynamics 34 (2002) H. 10, S. 1545-1555.
- [37] Cerestar Holding, B.V.: Daten über Erythrit. (2005)
- [38] *Clarke, J.*: Bulk sweeteners - multiple choice and the multi-sweetener concept. Food Tech Europe 5 (1995) H. 1, S. 185-187.
- [39] *Goossens, J. F. V. and H. W. W. Röper*: Erythritol - a new bulk sweetener. Food Ingr. 1 (1994) S. 27-33.
- [40] *Goossens, J. F. V. and M. H. A. Gonze*: Nutritional properties and applications of erythritol: a unique combination? In: Grenby, Trevor H. (Hrsg.): Advances in sweeteners 1 1996, S. 150-186. London, Blackie Academic & Professional.
- [41] *Kondou, T.*: Low-calorie compounded cocoa composition. M & C Sweeteners, LCC. 09/074371 (2000) H. US 6045850, S. 1-8. Blair / USA. 8-5-1998.

- [42] *van der Schueren, A., A. Rapaille and M. H. A. Gonze*: Process for the production of chocolate. Cerestar Holding, B. V. 794868 (1993) H. US 5244690, S. 1-6. BE.
- [43] *de Sadeleer, J. W. G. C. and M. H. A. Gonze*: Erythritol compositions. Cerestar Holding, B. V. 09/042729 (1999) H. US 5973212, S. 1-4. La Sas Van Gent / NL.
- [44] *Gonze, M. H. A. and F. M. L. van der Schueren*: Chocolate Composition. Cerestar Holding, B. V. 08/598533 (2000) H. US 6143345, S. 1-4. La Sas Van Gent / NL. 8-2-1996.
- [45] *Hartel, R. W. and C. Deymonaz*: Polyols and bulking agents in sugarfree chocolate. Manufacturing Confectioner 81 (2001) H. 6, S. 81-92.
- [46] *de Cock, P. W. H. A., S. D. Johnson, R. Nava, G. R. Schwetlik and H. Zoerb*: Reduced calorie confectionery compositions. Cargill, Inc. and Cerestar Holding, B. V. PCT/US2003/034604 (2004) H. WO 2004/040991, S. 1-49. Wayzata / Minnesota / USA; Sas van Gent / NL. 30-10-2003.
- [47] *Peterson, D. and E. Hakmiller*: Sugar-free cream icing. 09/441752 (2003) H. US20030152683-A1, S. 1-3. 17-11-1999.
- [48] *Peterson, D. and E. Hakmiller*: Baked good covered with sugar-free cream icing. United States Patent (2003)
- [49] *Rivier, V.*: Confectionery product having an enhanced cooling effect. European Patent Application 10/279933 (2003) H. US 2003/0068422 A1, S. 1-4. 25-10-2002.
- [50] *Rivier, V.*: Confectionery product containing functional ingredients. 10/277697 (2003) H. US 2003/0059501 A1, S. 1-11. 23-10-2002.
- [51] *Lin, S. D., C. F. Hwang and C. H. Yeh*: Physical and sensory characteristics of chiffon cake prepared with erythritol as replacement for sucrose. Journal of Food Science 68 (2003) H. 6, S. 2107-2110.
- [52] *de Cock, P. W. H. A.*: Sugar free gums. Food Ingredients and Analysis International 24 (2002) H. 4, S. 22-23.
- [53] *Record, D. W., G. N. McGrew and R. J. Yotka*: Kaugummizusammensetzungen mit Erythritol und einem Feuchtigkeitsbindemittel. Wm. Wrigley jr. Co. PCT/US94/11005 (2001) H. DE 69426983 T2, S. 1-18. Chicago / Illinois / USA. 30-9-1993.
- [54] *de Cock, P. W. H. A.*: Erythritol containing beverage imparting a cooling taste sensation. Cerestar Holding, B. V. 09/321875 (2000) H. US 6066345, S. 1-3. La Sas Van Gent / NL.
- [55] *de Cock, P. W. H. A.*: Erythritol - the sweet solution for tasty low-calorie drinks. Soft Drinks International (2002)

- [56] *Lee, T., G. Olcese, Z. Bell, G. Roy, W. Mutilangi, R. Hirs and P. Given*: Use of erythritol and D-tagatose in zero- or low-calorie beverages and food products. United States Patent Application Publication (2002)
- [57] *Lee, T., G. Olcese, Z. Bell, G. Roy, W. Mutilangi, R. Hirs and P. Given*: Use of erythritol and D-tagatose in zero- or low-calorie beverages and food products. Pepsico, Inc. PCT/US02/12483 (2002) H. WO 02/087358 A1, S. 1-26. New York / USA. 23-4-2002.
- [58] *Lee, T., G. Olcese, Z. Bell, G. Roy, W. Mutilangi, R. Hirs and P. Given*: Use of erythritol and D-tagatose in diet or reduced-calorie beverages and food products. Pepsico, Inc. PCT/US02/12484 (2002) H. WO 02/087359 A1, S. 1-12. New York / USA. 23-4-2002.
- [59] *Lee, T., G. Olcese, Z. Bell, G. Roy, W. Mutilangi, R. Hirs and P. Given*: Use of erythritol and D-Tagatose in zero- or low-calorie beverages and food products. Pepsico, Inc. 10/127455 (2002) H. US 2002/0197371 A1, S. 1-7. New York / USA. 23-4-2002.
- [60] *Lee, T., G. Olcese, Z. Bell, G. Roy, W. Mutilangi, R. Hirs and P. Given*: Use of erythritol and D-tagatose in diet or reduced-calorie beverages and food products. Pepsico, Inc. 10/127473 (2002) H. US 2002/0160090 A1, S. 1-4. New York / USA. 23-4-2002.
- [61] *Röper, H. W. W. and J. F. V. Goossens*: Erythritol, a new raw material for food and non-food applications. *Starch./Stärke*. 45 (1993) H. 11, S. 400-405.
- [62] *Adachi, S., K. Nagae and R. Matsuno*: Lipase-catalyzed condensation of erythritol and medium-chain fatty acids in acetonitrile with low water content. *J.Mol.Catal.B: Enzymatic* (1999) H. 6, S. 21-27.
- [63] *Hatanaka, C., T. Haraguchi, S. Ide, M. Goto, M. Goto and F. Nakashio*: Lipase-catalyzed synthesis of erythritol oleate. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 22 (1996) H. 4, S. 930-934.
- [64] *Piao, J., K. A. Takashi, S. Adachi, K. Nakanishi and R. Matsuno*: Continuous synthesis of lauroyl or oleoyl erythritol by a packed-bed reactor with an immobilized lipase. *Process Biochemistry* 39 (2004) H. 6, S. 681-686.
- [65] *Piao, J., T. Kobayashi, S. Adachi, K. Nakanishi and R. Matsuno*: Synthesis of mono- and dioleoyl erythritols through immobilized-lipase-catalyzed condensation of erythritol and oleic acid in acetone. *Biochemical Engineering Journal* 14 (2003) H. 2, S. 79-84.
- [66] *Tsuzuki, W., Y. Kitamura, T. Suzuki and S. Kobayashi*: Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. *Biotechnology and Bioengineering* 64 (1999) H. 3, S. 267-271.
- [67] *Letton, J. A., J. McGrady and D. J. Weigerber*: Fatty compositions with high solids content. The Procter and Gamble Company. 589858 (1992) H. US 5102683, S. 1-18. Cincinnati / Ohio / USA. 20-9-1990.

- [68] *Neissner, R.*: Herstellung, Analyse und DC-Trennung von Fettsäure-Erythritpartialestern. *Fette Seifen Anstrichmittel* 82 (1980) H. 1, S. 10-16.
- [69] *Jeon, E. J., I. H. Jung, K. S. Cho, E. S. Seo, D. Kim, S. J. Lee, K. H. Park and T. W. Moon*: Low cariogenicity of maltosyl-erythritol, major transglycosylation product of erythritol, by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13 (2003) H. 5, S. 815-818.
- [70] *Bernt, W. O., J. F. Borzelleca, G. Flamm and I. C. Munro*: Erythritol: A review of biological and toxicological studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 191-197.
- [71] *Pottie, M., G. de Lathauwer and M. Vandewalle*: Erythritol: a versatile precursor for C-4 chiral building blocks. *Bull.Soc.Chim.Belg.* 103 (1994) H. 5/6, S. 285-294.
- [72] *Ohmori, S., Y. Ohno, T. Makino and T. Kashiwara*: Characteristics of erythritol and formulation of a novel coating with erythritol termed thin-layer sugarless coating. *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) H. 2, S. 447-457.
- [73] *Endo, K., S. Amikawa, A. Matsumoto, N. Sahashi and S. Onoue*: Erythritol-based dry powder of glucagon for pulmonary administration. *International Journal of Pharmaceutics* 290 (2005) H. 1-2, S. 63-71.
- [74] *Okumura, M., S. Motegi, T. Ukigaya and K. Miyazaki*: Process for producing a solid which is rapidly soluble in the oral cavity. *Nikken Chemicals Corporation, Ltd. Pat.US.* 09/172018 (2001) H. US 6187336, S. 1-7. Tokyo / JP. 14-10-1998.
- [75] *Bergeim, F. H.*: Production of erythritol tetranitrate. *Du Pont de Nemours & Company.* (1928) H. US 1691954, S. 1-2. Wilmington / USA. 15-4-1927.
- [76] *Carol, J.*: Infrared analysis of erythritol tetranitrate, pentaerythritol tetranitrate, and mannitol hexanitrate. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 43 (1960) H. 2, S. 259-261.
- [77] *Boime, I. and F. E. Hunter*: Effects of glycerol trinitrate, mannitol hexanitrate and erythritol tetranitrate on electron transport and phosphorylation in liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 20 (1971) H. 3, S. 535-545.
- [78] *Kazakov, A. I., G. V. Lagodzinskaya, N. G. Yunda, L. P. Andrienko, A. M. Korolev, Y. I. Rubtsov, G. B. Manelis and L. T. Eremenko*: Nitration equilibrium in the meso-erythritol-aqueous nitric acid system. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* 40 (1991) H. 10, S. 1966-1971.
- [79] *Cervera, M. F., J. Heinamaki, K. Krogars, A. C. Jorgensen, M. Karjalainen, A. I. Colarte and J. Yliruusi*: Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *Aaps Pharmscitech* 5 (2004) H. 1
- [80] *Ouyang, B. Y., C. W. Chi, F. C. Chen, Q. F. Xi and Y. Yang*: High-conductivity poly (3,4-ethylenedioxythiophene): poly(styrene sulfonate) film and its

application in polymer optoelectronic devices. *Advanced Functional Materials* 15 (2005) H. 2, S. 203-208.

- [81] *Sharma, S. D., T. Iwata, H. Kitano and K. Sagara*: Thermal performance of a solar cooker based on an evacuated tube solar collector with a PCM storage unit. *Solar Energy* 78 (2005) H. 3, S. 416-426.
- [82] *Hidaka, H., M. Yamazaki, M. Yabe, H. Kakiuchi, E. P. Ona, Y. Kojima and H. Matsuda*: New PCMs prepared from erythritol-polyalcohols mixtures for latent heat storage between 80 and 100 °C. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 37 (2004) H. 9, S. 1155-1162.
- [83] *Abramson, S., E. Ashkenazi, K. Frische, I. Goldberg, L. Golender, M. Greenwald, N. G. Lemcoff, R. Madar, S. Weinman and B. Fuchs*: Novel podands and macrocycles with diacetal (tetraoxadecalin) cores: Synthesis, structure, stereochemistry and cation inclusion. *Chemistry-A European Journal* 9 (2003) H. 24, S. 6071-6082.
- [84] *Otey, F. H. and C. L. Mehlretter*: A simple preparation of 1,4-anhydroerythritol. *Journal of Organic Chemistry* 26 (1961) H. 5, S. 1673-ff.
- [85] *Klosterman, H. and F. Smith*: Threitan and erythritan and their reaction with periodate. *Keine Angabe* 74 (1952) S. 5336-5339.
- [86] *Kurszewska, M., E. Skorupa, R. Kasprzykowska, P. Sowinski and A. Wisniewski*: The solvent-free thermal dehydration of tetrutols on zeolites. *Carbohydr.Res.* (2000) H. 326, S. 241-249.
- [87] *Salzburg, H., H. Meyborg, W. Goyert and J. M. Barnes*: Verfahren zur Herstellung von Polyurethanelastomeren unter Verwendung von Diolen der Anhydro-tetrit-Reihe. Bayer AG. Pat.EP 84100477.3 (1984) H. EP 0115293 A2, S. 1-25. Leverkusen / D. 27-1-1983.
- [88] *Salzburg, H., H. Meyborg, W. Goyert and J. M. Barnes*: Verfahren zur Herstellung von Polyurethanelastomeren unter Verwendung von Diolen der Anhydro-tetrit-Reihe. Bayer AG. 84100477.3 (1984) H. EP 0115293 A3, S. 1. Leverkusen / D. 27-1-1983.
- [89] *Salzburg, H., H. Meyborg, W. Goyert and J. M. Barnes*: Verfahren zur Herstellung von Formkörpern auf Basis von Polyurethanelastomeren unter Verwendung von Diolen der Anhydro-tetrit-Reihe. Bayer AG. Pat.EP 84100477.3 (1989) H. EP 0115293 B1, S. 1-10. Leverkusen / D. 27-1-1983.
- [90] *Wachenfeld, E. and W. Burchard*: Epoxy resins based upon 1,4-anhydroerythritol: Kinetics and determination of branching. *Polymer* 28 (1987) H. 4, S. 817-824.
- [91] *Thiem, J. and F. Bachmann*: Synthesis and properties of polyamides derived from anhydro- and dianhydroalditols. *Makromol.Chem.* (1991) H. 192, S. 2163-2182.
- [92] *Thiem, J. and T. Häring*: Ring-opening polymerization of cis-3,4-dimethoxyololane. *Makromol.Chem.* (1987) H. 188, S. 711-718.

- [93] *Li, G., T. Otani, H. Fujita, H. Tajima and H. Kawakami*: Polyol polymers, meso-erythritol polymers and their aliphatic acid esters and aliphatic ethers. Li, Ge, Otani, Takahito, Fujita, Hiromi, Tajima, Hirokuni, and Kawakami, Hitoshi. 10/162643 (2003) H. US 2003/0017132 A1, S. 1-11. Fukui /JP. 6-6-2002.
- [94] *Fjeldskaar, I. R., D. Grace, C. Romming and L. Skattebol*: Reactions of alpha-hydroxy ketones with glycerol, 1-thioglycerol and meso-erythritol. Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry 42 (1988) H. 5, S. 280-288.
- [95] *Haines, A. H. and A. G. Wells*: Formation of a dioxane derivative in acid-catalyzed dehydration of erythritol: trans-2,5-Di-(1,2-dihydroxyethyl)-1,4-dioxane. Carbohydrate Research 27 (1973) H. 1, S. 261-264.
- [96] *Jensen, R. B., O. Buchardt, S. E. Jorgensen, J. U. R. Nielsen, G. Schroll and C. Altona*: Reactions between formaldehyde and polyhydric alcohols. 1. 5-Membered, 6-membered, 7-membered, and 12-membered cyclic acetals from meso-erythritol and formaldehyde. Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry B 29 (1975) H. 3, S. 373-378.
- [97] *Glaçon, V., M. Benazza, D. Beaupère and G. Demailly*: Heterocyclisation of free or partially protected alditols via their bis-cyclic sulfate derivatives. Versatzlie synthesis of aza and thiodeoxyanhydroalditol with *erythro*, *threo*, *arabino*, *gulo*, *talo* or *manno* configuration. Tet.Hedr.Lett. 41 (2000) H. 26, S. 5053-5056.
- [98] *Halila, S., M. Benazza and G. Demailly*: New synthesis of alditol thiaheterocycles via ring closure of vicinal bis-cyclic thionocarbonates of alditols. Tetrahedron Letters 43 (2002) H. 5, S. 815-818.
- [99] *Cherqoui, A., D. Takky, K. B. Kokoh, F. Hahn, E. M. Belgsir, J. M. Léger and C. Lamy*: Electro-oxidation of meso-erythritol on platinum in acid medium: analysis of the reaction products. Journal of Electroanalytical Chemistry 464 (1998) S. 101-109.
- [100] *Singh, B., D. Singh, S. Bajpai and A. KUMAR*: Kinetics and mechanism of Ruthenium(III) catalysis in the oxidation of erythritol and dulcitol by N-bromoacetamide. Transition Metal Chemistry 16 (1991) H. 6, S. 610-613.
- [101] *Stankovic, L. and M. Fedoronko*: Oxidation of erythritol, D-threitol, erythrot-2,3- and threo-2,3-butanediols respectively, by Mercury(II)acetate. Chemikckâe zvesti - Slovenskâa Akadâemia Vied 25 (1971) H. 6, S. 441-444.
- [102] *Klüfers, P. and O. Labisch*: Polyol metal complexes. 44 - Phenylboronic acid esters of the C-4 sugar alcohols erythritol and L-threitol. Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie 629 (2003) H. 7-8, S. 1441-1445.
- [103] *Haddock, E. A., R. K. Gupta, S. M. K. Alshafi, K. Layden, E. Haslam and D. Magnolato*: The Metabolism of Gallic Acid and Hexahydroxydiphenic Acid in Plants .4. Biogenetic and Molecular Taxonomic Considerations. Phytochemistry 21 (1982) H. 5, S. 1049-1062.
- [104] • *Haslam, E.*: Chemistry of vegetable tannins. London: Academic Press, 1966

- [105] *Haslam, E.*: Plant Polyphenols (Syn Vegetable Tannins) and Chemical Defense - A Reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14 (1988) H. 10, S. 1789-1805.
- [106] *Haslam, E. and T. H. Lilley*: Natural Astringency in Foodstuffs - A Molecular Interpretation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 27 (1988) H. 1, S. 1-40.
- [107] *Haslam, E.*: 22Nd Procter Memorial Lecture Vegetable Tannins - Renaissance and Reappraisal. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 72 (1988) H. 2, S. 45-64.
- [108] • *Tang, H. R., R. A. Hancock and A. D. Covington*: Plant polyphenols: synthesis, properties, significance 1992 S. 437-ff. New York, Plenum Publishing Corp.
- [109] *Chen, C., H. R. Tang, L. H. Sutcliffe and P. S. Belton*: Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: Direct evidence from electron spin resonance studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) H. 11, S. 5710-5714.
- [110] *Gao, J. T., H. R. Tang and B. L. Zhao*: Toxicologic damage of gas phase cigarette smoke on cells and the protective effect of green tea polyphenols. *Research on Chemical Intermediates* 27 (2001) H. 3, S. 269-279.
- [111] *Okamura, H., A. Mimura, Y. Yakou, M. Niwano and Y. Takahara*: Antioxidant Activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus-Rostrata*. *Phytochemistry* 33 (1993) H. 3, S. 557-561.
- [112] *Gali, H. U., E. M. Perchellet, D. S. Klish, J. M. Johnson and J. P. Perchellet*: Antitumor-Promoting Activities of Hydrolyzable Tannins in Mouse Skin. *Carcinogenesis* 13 (1992) H. 4, S. 715-718.
- [113] *Gali, H. U., E. M. Perchellet, X. M. Gao, V. Bottari and J. P. Perchellet*: Antitumor-Promoting Effects of Gallotannins Extracted from Various Sources in Mouse Skin In-Vivo. *Anticancer Research* 13 (1993) H. 4, S. 915-922.
- [114] *Romert, L., T. Jansson, M. Curvall and D. Jenssen*: Screening for Agents Inhibiting the Mutagenicity of Extracts and Constituents of Tobacco Products. *Mutation Research-Genetic Toxicology* 322 (1994) H. 2, S. 97-110.
- [115] *Tang, H. R., A. D. Covington and R. A. Hancock*: Synthesis and spectroscopic characterisation of the polygalloyl esters of polyols-models for gallotannins. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 87 (2003) H. 5, S. 179-188.
- [116] *Imfeld, D., D. Schmidhalter, M. L. Hischier, M. A. Meyer and A. Imboden*: Process for the biotechnological preparation of L-erythrulose. Lonza AG and Pentapharm, Ltd. PCT/EP00/12357 (2001) H. WO 01/42483 A1, S. 1-17. Basel / Basel / CH; Basel / Basel / CH. 7-12-2000.

- [117] *Schreier, T. and R. Jermann*: Kombination von Erythulose und einem reduzierenden Zucker mit Selbstbräunungseigenschaften. Pentapharm, Ltd. PCT/CH98/00083 (2000) H. EP 1014925 A1, S. 1. Basel / CH. 27-2-1998.
- [118] *Wachter, R. and G. Schäfer*: Selbstbräunungsmittel. Cognis, Deutschland GmbH. (2000) H. DE 19857010 A1, S. 1-4. Düsseldorf / D. 10-12-1998.
- [119] *de Wilde, H., P. De Clercq, M. Vandewalle and H. Roper*: L-(S)-Erythulose - a novel precursor to L-2,3-O-isopropylidene-C₃ chirons. Tetrahedron Letters 28 (1987) H. 40, S. 4757-4758.
- [120] *van der Eycken, E., H. de Wilde, L. Deprez and M. Vandewalle*: L-(S)-Erythulose: the synthesis of (R)-1,2,4-butanetriol and of some related C₄-chirons. Tet.Hedr.Lett. 28 (1987) H. 40, S. 4759-4760.
- [121] *Hara, M., T. Kawaguchi and M. Ueda*: Production of threitol. Mitsubishi Chemical Corporation. (1999) H. JP 11266887, S. 1. Tokyo / Japan. 20-3-1998.
- [122] *Csanyi, E., T. Horvath, E. Kiraly, K. Lapis and L. Kopper*: New Type Bifunctional Nitrosoureido Derivatives with Cytostatic Activity. Oncology 37 (1980) S. 59-66.
- [123] *Hilger, R. A., G. Jacek, C. Oberhoff, S. Kredtke, J. Baumgart, S. Seeber and M. E. Scheulen*: Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer. Clinical Cancer Research 5 (1999) S. 3840S.
- [124] *KopfMaier, P. and G. Sass*: Antitumor activity of treosulfan in human lung carcinomas. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 37 (1996) H. 3, S. 211-221.
- [125] *Fichtner, I., M. Becker and J. Baumgart*: Antileukaemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukaemias (ALL). European Journal of Cancer 39 (2003) H. 6, S. 801-807.
- [126] *Bemis, G. W. and P. R. Chaturvedi*: Methods and compositions using butyrate esters of threitol. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. PCT/US96/17224 (1997) H. WO 97/16180, S. 1-31. Cambridge / MA / USA. 30-10-1996.
- [127] *Hidaka, H., M. Yamazaki, M. Yabe, H. Kakiuchi, E. P. Ona, Y. Kojima and H. Matsuda*: Evaluation of fundamental characteristics of threitol for latent heat storage for hot water supply. Kagaku Kogaku Ronbunshu 30 (2004) H. 4, S. 552-555.
- [128] *Rau, U., L. A. Nguyen, S. Schulz, V. Wray, M. Nimtz, H. Roeper, H. Koch and S. Lang*: Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. Applied Microbiology and Biotechnology 66 (2005) H. 5, S. 551-559.
- [129] *Vértesy, L., M. Kurz, G. Noelken and J. Wink*: Ustilipides, method for the production and the use thereof. Aventis Pharma Deutschland GmbH.

09/600759 (2002) H. US 6472158 B1, S. 1-ff. Frankfurt am Main / Deutschland. 19-1-1999.

- [130] *Im, J. H., T. Nakane, H. Yanagishita, T. Ikegami and D. Kitamoto:* Mannosylerythritol lipid, a yeast extracellular glycolipid, shows high binding affinity towards human immunoglobulin G. BMC.Biotechnol. 1 (2001) H. 1, S. 5.
- [131] *Im, J. H., H. Yanagishita, T. Ikegami, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura and D. Kitamoto:* Mannosylerythritol lipids, yeast glycolipid biosurfactants, are potential affinity ligand materials for human immunoglobulin G. J.Biomed.Mater.Res.A 65 (2003) H. 3, S. 379-385.
- [132] *Kitamoto, D., H. Yanagishita, A. Endo, M. Nakaiwa, T. Nakane and T. Akiya:* Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage. Biotechnol.Prog. 17 (2001) H. 2, S. 362-365.
- [133] *Reppe, W. and R. Schnabel:* Verfahren zur Herstellung von Erythrit. IG Farbenindustrie AG. (1943) H. DE 734 025, S. 1-2. Frankfurt am Main / Deutschland. 26-2-1938.
- [134] *Pfeifer, V. F., V. E. Sohns, H. F. Conway, E. B. Lancaster, S. Dabic and E. L. Griffin:* Two-stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid. Industrial and Engineering Chemistry 52 (1960) H. 3, S. 201-206.
- [135] *Sloan, J. W., B. T. Hofreiter, C. L. Mehlretter and I. A. Wolff:* Hydrogenolysis of dialdehyde starch to erythritol and ethylene glycol. Government of the United States of America. 549206 (1957) H. US 2783283, S. 1-4. Illinois / USA. 23-11-1955.
- [136] *Sloan, J. W. and I. A. Wolff:* Hydrogenolysis of dialdehyde starch to erythritol and ethylene glycol. Government of the United States of America. 496958 (1957) H. US 2796447, S. 1-2. Illinois / USA. 25-3-1955.
- [137] *Trenner, N. R. and F. A. Bcher:* Hydrogenation of tartaric acid esters to erythritol. Merck & Co.,Inc. (1951) H. US 2571967, S. 1-3. New Jersey / USA. 9-11-1948.
- [138] *Elseviers, M., H. W. W. Röper, R. H. F. Beck and S. M. J. Coomans:* Method for production of tetritols, specifically meso-erythritol. Cerestar Holding, B. V. 724784 (1998) H. US 5756865, S. 1-5. La Sas Van Gent / NL. 3-10-1996.
- [139] *Spencer, J. F. T. and H. R. Sallans:* Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. Canadian Journal of Microbiology 2 (1956) H. 2, S. 72-79.
- [140] *Onishi, H.:* Studies on osmophilic yeasts. Part VIII. Polyalcohol production by various genera and species of yeasts. Bull.Agr.Chem.Soc.Japan. 24 (1960) H. 2, S. 131-140.
- [141] *Onishi, H.:* Studies on osmophilic yeasts. Part XII. Characteristic aspects on the assimilation and fermentation of sugars by osmophilic yeasts in the

- environment of a high concentration of sodium chloride. *Agricultural and Biological Chemistry* 25 (1961) H. 5, S. 341-349.
- [142] *Onishi, H. and T. Suzuki*: Production of erythritol, D-arabitol, D-mannitol and a heptitol-like compound from glycerol by yeasts. *J.Ferment.Technol.* 48 (1970) H. 9, S. 563-566.
- [143] *Spencer, J. F. T.*: Production of polyhydric alcohols by yeasts. In: Hockenhull, D. J. D. (Hrsg.): *Progress in Industrial Microbiology* 7 1968 , S. 1-42. London, J. and A. Churchill Ltd.
- [144] *Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer*: Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. In: Rose, A. H. (Hrsg.): *Primary Products of Metabolism* 1978 , S. 393-425. New York, Academic Press.
- [145] *Ishizuka, H., K. Tokuoka, T. Sasaki and H. Taniguchi*: Purification and some properties of an erythrose reductase from an *Aureobasidium sp.* mutant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56 (1992) H. 6, S. 941-945.
- [146] *Lee, J. K., S. Y. Kim, Y. W. Ryu, J. H. Seo and J. H. Kim*: Purification and characterization of a novel erythrose reductase from *Candida magnoliae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) H. 7, S. 3710-3718.
- [147] *Ookura, T., K. Azuma, K. Isshiki, H. Taniguchi, T. Kasumi and Y. Kawamura*: Primary structure analysis and functional expression of erythrose reductases from erythritol-producing fungi (*Trichosporonoides megachiliensis* SNG-42). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69 (2005) H. 5, S. 944-951.
- [148] *Ookura, T., T. Kasumi and E. Asaba*: Polynucleotides coding for the type III, II and I erythrose reductases from *Trichosporonoides megachiliensis* and uses thereof for the production of erythritol. National Food Research Institute and Nikken Chemicals Corporation, Ltd. 02000321.6 (2002) H. EP 1221478 A2, S. 1-39. Ibaraki / JP; Tokyo / JP. 4-1-2002.
- [149] *Ookura, T., T. Kasumi and E. Asaba*: Polynucleotides coding for the type III, II and I erythrose reductases from *Trichosporonoides megachilensis* and uses thereof for the production of erythritol. National Food Research Institute Tsukuba-shi and Nikken Chemicals Corporation, Ltd. 02000321.6 (2002) H. EP 1221478 A3, S. 1-3. Ibaraki / JP; Tokyo / JP. 4-1-2002.
- [150] *Tokuoka, K., H. Ishizuka, K. Wako and H. Taniguchi*: Comparison of three forms of erythrose reductase from an *Aureobasidium sp.* mutant. *Journal of General and Applied Microbiology* 38 (1992) H. 2, S. 145-155.
- [151] *Hohmann, S. and W. H. Mager*: Shaping up: The response of yeast to osmotic stress. Chapter 4. In: *Yeast stress responses*. Springer Verlag. Buch (1997) S. 101-145.
- [152] *Mager, W. H. and M. Siderius*: Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research* 2 (2002) H. 3, S. 251-257.
- [153] *Chmiel, H.*: Bioprozeßtechnik 1 und 2. Gustav Fischer, 1991

- [154] *Schlegel, H. G. and C. Zaborosch: Allgemeine Mikrobiologie. (7) Stuttgart: Thieme, 1992*
- [155] *Crafts, A. S., H. B. Currier and C. R. Stocking: Water in the physiology of plants.) Waltham/Mass. / USA: Chronica Botanica Co., 1949*
- [156] *Robinson, R. A. and R. H. Stokes: Electrolyte solutions. London: Academic Press, 1955*
- [157] *de Troostembergh, J.-C. M.-P. G., I. A. Debonne and W. R. Obyn: Process for producing and recovering erythritol from culture medium containing the same. Cerestar Holding, B. V. Pat.EP 00310979.0 (2001) H. EP 1106698 A2, S. 1-8.8-12-2000.*
- [158] *Lin, S.-J., C.-Y. Wen, C.-C. Huang and W.-S. Chu: Erythritol-producing Moniliella strains. 10/200730 (2003) H. US 2003/0008378 A1, S. 1-5. Hsinchu / TW. 22-7-2002.*
- [159] *Kim, S. Y., D.-K. Oh and S. R. Jung: Fermentation process for preparing erythritol using novel cell of Pichia. Bolak Co. Ltd. and Dong Cheon Consulting Co. 99307616.5 (2001) H. EP 1088893 A1, S. 1-10. Kyunggi-Do / KOR; Seoul / KOR.*
- [160] *Hajny, G. J., J. H. Smith and J. C. Garver: Erythritol production by a yeastlike fungus. Appl.Microbiol. 12 (1964) H. 3, S. 240-246.*
- [161] *Dezeeuw, J. R. and E. J. Tynan: Fermentation process for the production of erythritol. Pfizer Inc. Pat.US. (1973) H. US 3756917, S. 1-6. New York / USA. 12-11-1971.*
- [162] *Hattori, K. and T. Suzuki: Production of erythritol by n-alkane grown yeasts. Agricultural and Biological Chemistry 38 (1974) H. 3, S. 581-586.*
- [163] *Ishizuka, H., K. Wako, T. Kasumi and T. Sasaki: Breeding of a mutant of Aureobasidium sp. with high erythritol production. J.Ferment.Bioeng. 68 (1989) H. 5, S. 310-314.*
- [164] *Bisping, B., U. Baumann, H. Hellfors and H. J. Rehm: Formation of polyols by immobilized fungi. de Bond, J. A. M, Visser, Jan, Mattiasson, B., and Tramper, Johannes. 5th European Congress on Biotechnology (1989) , S. 387-393. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 10-12-1989.*
- [165] *Horikita, H., N. Hattori, Y. Takagi, G. Kawaguchi and T. Maeda: A process for producing erythritol. NGK Insulators,Ltd., Nikken Chemicals Corporation, Ltd., and Mitsubishi Kasei Corporation. Pat.EP 89300974.6 (1989) H. EP 0327342 A2, S. 1-7. Tokyo / JP. 1-2-1989.*
- [166] *Sasaki, T., T. Kasumi, N. Kubo, K. Kainuma, K. Wako, H. Ishizuka, G. Kawaguchi and T. Oda: Novel Aureobasidium sp. microorganisms, method for obtaining the same and method for preparing erythritol with the same. Director of National Food Research Insitute, Ministry of Agriculture and Nikken Chemicals Corporation, Ltd. 088858 (1990) H. US 4939091, S. 1-21. Ibaraki / JP; Tokyo / JP. 24-8-1987.*

- [167] *Höötman, U., B. Bisping and H. J. Rehm*: Physiology of polyol formation by free and immobilized cells of the osmotolerant yeast *Pichia farinosa*. Applied Microbiology and Biotechnology 35 (1991) S. 258-263.
- [168] *Veiga Da Cunha, M., P. Firme, M. V. san Romão and H. Santos*: Application of ^{13}C nuclear magnetic resonance to elucidat the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. Appl.Environ.Microbiol. 58 (1992) H. 7, S. 2271-2279.
- [169] *Omar, S. H., S. Honecker and H. J. Rehm*: A comperative study on the formation of citric acid and polyols and on morphological changes of three strains of free and immobilized *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology 36 (1992) , S. 518-524.
- [170] *Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore and Y. K. Park*: Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. Biotechnology Letters 15 (1993) H. 4, S. 383-388.
- [171] *Kim, S. Y., K. H. Lee, J. H. Kim and D.-K. Oh*: Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. Biotechnology Letters 19 (1997) H. 8, S. 727-729.
- [172] *Ueda, M. and K. Yamagishi*: Method for producing erythritol. Mitsubishi Chemical Corporation. Pat.EP 96115557.9 (1997) H. EP 0770683 A1, S. 1-6. Tokyo / JP. 27-9-1996.
- [173] *Chang, C. C. and Y. T. Liu*: Isolation of an erythritol-producing yeast and studies on its culture conditions. Bericht (1997) H. 155, S. 55-67.Report of the Taiwan Sugar Research Institute.
- [174] *Yang, J. P. W.*: Recent research achievements and current trend of products and process developement at the Taiwan Sugar Research Institute. Buch 44 (1997) H. 3, S. 8-21.
- [175] *Abe, S. and M. Satoshi*: Method of producing erythritol. Mitsubishi Chemical Corporation. Pat.EP 97121067.9 (1998) H. EP 0845538 A2, S. 1-12. Tokyo / JP.
- [176] *Park, J., B. Seo, J. Kim and Y. Park*: Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp. J.Gen.Appl.Microbiol. 86 (1998) H. 6, S. 577-580.
- [177] *Sheiru, K.*: New mutant strain of *Trichosporonoides* sp. for erythritol manufacture. Pat.JP (1999)
- [178] *Hirata, Y., K. Igarashi, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka*: High-level production of erythritol by strain 618A-01 isolated from pollen. J.Biosci.Bioeng. 87 (1999) H. 5, S. 630-635.
- [179] *Cho, H., S. Abe, K. Yamagishi and S. Morioka*: Method of producing erythritol. Mitsubishi Chemical Corporation. Pat.EP 98122598.0 (1999) H. EP 0940471 A1, S. 1-11. Tokyo / JP. 4-12-1998.

- [180] Kim, S. Y., D.-K. Oh and S. R. Jung: Fermentation process for preparing erythritol using mutant cells by controlling osmotic pressure. Bolak Co. Ltd. Pat.US. 09/021304 (1999) H. US 5989878, S. 1-5. Kyunggi-Do / KOR. 10-2-1988.
- [181] Kim, S. Y., D.-K. Oh and S. R. Jung: Process for preparing erythritol using novel cells of *Pichia*. Dong Cheon Consulting Co. Pat.US. 09/154218 (1999) H. US 6001616, S. 1-6. Seoul / KOR. 16-9-1998.
- [182] Kristofikova, L., M. Rosenberg and H. Mikova: Selection of erythritol-producing strains. European Congress of Biotechnology 9, Juli 1999. Poster. (1999)
- [183] Nishita, K. and N. Uetake: Method for producing polyol by recycling microorganism. Nikken Chemicals Corporation, Ltd. 99102168.4 (1999) H. EP 0 939 133 A2, S. 1-6. Tokyo / JP. 3-2-1999.
- [184] Yang, S. W., J. B. Park, N. S. Han, Y. W. Ryu and J. H. Seo: Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. Biotechnology Letters 21 (1999) H. 10, S. 887-890.
- [185] Segueilha, L.: Process for producing erythritol by repeated fedbatch fermentation. Pat.JP (1999) S. 1.
- [186] Park, J. B., B. C. Seo and J. R. Kim: Fermentation process for preparing erythritol using *Trichosporonoides madida* DS 911. Doosan Corporation. 09/141137 (2000) H. US 6060291, S. 1-4. Seoul / ROK. 27-8-1998.
- [187] Kim, S. Y., D.-K. Oh and S. R. Jung: Fermentation process for preparing erythritol using mutant cells by controlling osmotic pressure. Bolak Co. Ltd. 09/384435 (2000) H. US 6162636, S. 1-5. Kyunggi-Do / KOR.
- [188] Ryu, Y. W., C. Y. Park, J. B. Park, S. Y. Kim and J. H. Seo: Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24 (2000) H. 25, S. 100-103.
- [189] Lee, J. K., S. J. Ha, S. Y. Kim and D.-K. Oh: Increased erythritol production in *Torula* sp by Mn^{2+} and Cu^{2+} . Biotechnology Letters 22 (2000) H. 12, S. 983-986.
- [190] Kim, S. Y., D.-K. Oh and S. R. Jung: Fermentation process for preparing erythritol using mutant cells of *Trigonosis variabilis* by controlling osmotic pressure. Bolak Co. Ltd. and Dong Cheon Consulting Co. 99307618.1 (2001) H. EP 1088894 A1, S. 1-10. Kyunggi-Do / KOR; Seoul / KOR.
- [191] Kim, S. Y., D.-K. Oh, B. S. Noh, S. R. Jung and K. A. Kim: Fermentation process for preparing erythritol using mother liquor produced from purification process of palatinose. Bolak Co. Ltd. and Dong Cheon Consulting Co. PCT/KR99/00758 (2001) H. WO 01/42482 A1, S. 1-18. Kyunggi-Do / KOR; Seoul / KR. 10-12-1999.
- [192] Seo, J. H., Y. W. Ryu, S. R. Jung and S. Y. Kim: Fermentation process for preparing erythritol by a high salt tolerant mutant of *Candia* sp. Bolak Co. Ltd. 99307617.3 (2001) H. EP 1092781 A1, S. 1-9. Kyunggi-Do / KOR. 28-9-1999.

- [193] Lin, S.-J., C.-Y. Wen, J.-C. Liao and W.-S. Chu: Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. *Process Biochemistry* 36 (2001) H. 12, S. 1249-1258.
- [194] Lee, J. K., S. J. Ha, S. Y. Kim and D.-K. Oh: Increased erythritol production in *Torula* sp. with inositol and phytic acid. *Biotechnology Letters* 23 (2001) H. 7, S. 497-500.
- [195] Oh, D.-K., C. H. Cho, J. K. Lee and S. Y. Kim: Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2001) H. 26, S. 248-252.
- [196] Burschäpers, J., K. Schustolla, K. Schügerl, H. W. W. Röper and J.-C. M.-P. G. de Troostembergh: Engineering aspects for the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*. Part I. Batch and fed-batch operation in stirred tank. *Process Biochemistry* 38 (2002) H. 4, S. 497-506.
- [197] Burschäpers, J., K. Schustolla, K. Schügerl, H. W. W. Röper and J.-C. M.-P. G. de Troostembergh: Engineering aspects for the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*. Part II. Batch and fed-batch operation in bubble column and airlift tower loop if reactors. *Process Biochemistry* 38 (2002) H. 4, S. 559-570.
- [198] Lee, J. K., B. S. Koo and S. Y. Kim: Fumarate-mediated inhibition of erythrose reductase, a key enzyme for erythritol production by *Torula corallina*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) H. 9, S. 4534-4538.
- [199] Lee, D. Y., Y. C. Park, H. J. Kim, Y. W. Ryu and J. H. Seo: Proteomic analysis of *Candida magnoliae* strains by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 3 (2003) H. 12, S. 2330-2338.
- [200] Lee, K. J. and J. Y. Lim: Optimized conditions for high erythritol production by *Penicillium* sp KJ-UV29, mutant of *Penicillium* sp KJ81. *Biotechnology and Bioengineering* 8 (2003) H. 3, S. 173-178.
- [201] Dooms, L., G. L. Hennebert and H. Verachtert: Polyol synthesis and taxonomic characters in the genus *Moniliella*. *Antonie van Leeuwenhoek* 37 (1971) S. 107-118.
- [202] Anonymus: The latest market report of functional sweeteners. Up-to-date. *Food Processing*. 35 (2001) H. 11, S. 34-40.
- [203] Hoppe, S.: Bippes, Michael. (2005)
- [204] Batisheva, S. Y., A. Posdnjakov, G. Kusnetchova and S. Sheveleva: Effect of erythritol on intestinal microflora and morphology of internal organs in rats. *Voprosy Pitaniya* 71 (2002) H. 3, S. 36-39.
- [205] Hiele, M., Y. Ghoo, P. Rutgeerts and G. Vantrappen: Metabolism of erythritol in humans - comparison with glucose and lactitol. *British Journal of Nutrition* 69 (1993) H. 1, S. 169-176.

- [206] *Munro, I. C., W. O. Bernt, J. F. Borzelleca, G. Flamm, B. S. Lynch, E. Kennepohl, E. A. Bär and J. Modderman*: Erythritol: An interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data. *Food and Chemical Toxicology* 36 (1998) H. 12, S. 1139-1174.
- [207] *Bornet, F. R. J.*: Undigestible sugars in foods products. *American Journal of Clinical Nutrition* 59 (1994) H. 3S, S. 763-769.
- [208] *Bornet, F. R. J., A. Blayo, F. Dauchy and G. Slama*: Plasma and urine kinetics of erythritol after oral ingestion by healthy humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 280-285.
- [209] *Ishikawa, M., M. Miyashita, Y. Kawashima, T. Nakamura, N. Saitou and J. Modderman*: Effects of oral administration of erythritol on patients with diabetes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 303-308.
- [210] *Bornet, F. R. J., A. Blayo, F. Dauchy and G. Slama*: Gastrointestinal response and plasma and urine determinations in human subjects given erythritol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 296-302.
- [211] *Tetzloff, W., F. Dauchy, S. Medimagh, D. Carr and A. Bar*: Tolerance to subchronic, high-dose ingestion of erythritol in human volunteers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 286-295.
- [212] *Yunginger, J. W., R. T. Jones, H. Kita, K. Saito, S. L. Hefle and S. L. Taylor*: Allergic reactions after ingestion of erythritol-containing foods and beverages. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108 (2001) H. 4, S. 650.
- [213] *Yunginger, J. W., H. Kita, R. T. Jones, K. Saito, S. L. Hefle and S. L. Taylor*: Systemic allergic reactions following ingestion of erythritol-containing foods and beverages. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 (2001) H. 2, S. 269.
- [214] *Lina, B. A. R., M. H. M. BosKuijpers, H. P. Til and A. Bar*: Chronic toxicity and carcinogenicity study of erythritol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 264-279.
- [215] *Waalkens-Berendsen, D. H., A. E. Smits-van Prooije, M. V. M. Wijnands and A. Bär*: Two-generation reproduction study of erythritol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 237-246.
- [216] *Noda, K., K. Nakayama and J. Modderman*: Fate of erythritol after single oral administration to rats and dogs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 206-213.
- [217] *van Ommen, B., B. de Bie and A. Bär*: Disposition of ¹⁴C-erythritol in germfree and conventional rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. S198-S205.
- [218] *Til, H. P. and J. Modderman*: Four-week oral toxicity study with erythritol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 214-220.

- [219] *Til, H. P., C. F. Kuper, H. E. Falke and A. Bar*: Subchronic oral toxicity studies with erythritol in mice and rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 221-231.
- [220] *Dean, I., F. Jackson and R. J. Greenough*: Chronic (1-year) oral toxicity study of erythritol in dogs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 254-260.
- [221] *Kawamura, Y., Y. Saito, M. Imamura and J. P. Modderman*: Mutagenicity studies on erythritol in bacterial reversion assay systems and in Chinese hamster fibroblast cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 261-263.
- [222] *Shimizu, M., M. Katoh, M. Imamura and J. Modderman*: Teratology study of erythritol in rabbits. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24 (1996) H. 2, S. 247-253.
- [223] *de Troostembergh, J.-C. M.-P. G. and J. F. V. Goossens*: Anti-cariogenic activity of erythritol. *Cerestar Holding, B. V. 08/844452* (2001) H. US 6177064 B1, S. 1-12. La Sas Van Gent / NL. 18-4-1997.
- [224] *Shinsato, E.*: Confectionery ingredient update. *Cereal Foods World* 41 (1996) H. 5, S. 373-375.
- [225] *Kawanabe, J., M. Hirasawa, T. Takeuchi, T. Oda and T. Ikeda*: Noncariogenicity of erythritol as a substrate. *Caries Res.* 26 (1992) H. 5, S. 358-362.
- [226] *Hartmeier, W.*: Immobilisierte Biokatalysatoren. Berlin: Springer, 1986
- [227] *Vorlop, K. D. and J. Klein*: Immobilization techniques. In: Moo-Young. (Hrsg.): 1985, S. 203-224. Pergamon Press.
- [228] *Klein, J., K. D. Vorlop and H. J. Steinert*: Biocatalyst and method for its manufacture. (1984) H. DE 3432923, S. 1-ff.
- [229] *Buchholz, K. and V. Kasche*: Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. Weinheim: VCH, 1997
- [230] *Hörold, S.*: Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitrat- und Nitritentfernung in der Trinkwasseraufbereitung. (1995), TU Braunschweig.
- [231] *Prüße, U., S. Hörold and K. D. Vorlop*: Verkapselung mikroskopischer Katalysatoren in gelförmigen Polymernetzwerken. *Chemie-Ingenieur-Technik* 69 (1997) H. 1+2, S. 100-103.
- [232] *Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek*: Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8 (1990) H. 3, S. 71-78.
- [233] *Gemeiner, P., L. Kurillova, O. Markovic, A. Malovikova, D. Uhrin, M. Ilavsky, V. Stefuca, M. Polakovic and V. Bales*: Calcium Pectate Gel Beads for Cell Entrapment .3. Physical-Properties of Calcium Pectate and Calcium Alginate

- Gel Beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 13 (1991) H. 3, S. 335-345.
- [234] *Vorlop, K. D. and J. Klein*: Entrapment of microbial cells in chitosan. *Methods Enzymol.* 135 (1987) S. 259-268.
- [235] *Wittlich, P.*: Biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 und thermophilen Mikroorganismen. (2001) S. 1-130. TU Braunschweig.
- [236] *Lozinsky, V. I., E. S. Vainerman, L. V. Domotenko, A. M. Mamtsis, E. F. Titova, E. M. Belavtseva and S. V. Rogozhin*: Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinylalcohol) aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science* 264 (1986) H. 1, S. 19-24.
- [237] *Muscat, A.*: Entwicklung und Charakterisierung von polymeren Träger- und Immobilisierungsmaterialien für eine verbesserte Sauerstoffversorgung. Dissertation (1995) , S. 1-126. Technische Universität Braunschweig.
- [238] *Jekel, M. and K. D. Vorlop*: Bioencapsulation technology. Dautzenberg, Horst and Poncelet, Denis. (1996) S. 1-16. Potsdam. Proceedings of the international workshop BIOENCAPSULATION V.
- [239] *Jen, A. C., M. C. Wake and A. G. Mikos*: Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 50 (1996) H. 4, S. 357-364.
- [240] *Mathur, A. M., S. K. Moorjani and A. B. Scranton*: Methods for synthesis of hydrogel networks: A review. *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics* C36 (1996) H. 2, S. 405-430.
- [241] *Wittlich, P., M. Schlieker, T. Willke and K.-D. Vorlop*: Leistungssteigerung biotechnischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. Tagungsunterlagen : 2. Workshop Biokonversion nachwachsender Rohstoffe ; 14.-15. Oktober 1999 in Braunschweig 1999 S. 19. Braunschweig, FAL.
- [242] *Ariga, O., K. Itoh, Y. Sano and M. Nagura*: Encapsulation of Biocatalyst with Pva Capsules. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78 (1994) H. 1, S. 74-78.
- [243] *Varfolomeyev, S. D., E. I. Rainina, V. I. Lozinsky, S. V. Kalyuzhnyi, A. P. Sinitsyn, T. A. Makhlis, G. P. Bachurina, I. G. Bokova, O. A. Sklyankina and E. B. Agafonov*: Application of polyvinyl alcohol crypgels for immobilization of mesophilic and thermophilic microorganisms. In: de Bond, J. A. M, Visser, J., Mattiasson, B., and Tramper, Johannes. (Hrsg.): *Physiology of immobilized cells* 1990 Amsterdam, Elsevier Science.
- [244] *Vorlop, K. D. and P. Remmers*: Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. (1990) H. DE 4027218
- [245] *Willke, B.*: Problemorientierte Stammentwicklung von *Paracoccus denitrificans* zur Trinkwasserdenitrifikation und neue, lichtmikroskopische Methoden zur In-

- vivo-Untersuchung von immobilisierten Mikroorganismen. (1992), Technische Universität Braunschweig.
- [246] *Klein, J. and K. D. Vorlop*: Immobilization techniques. In: Moo-Young, M. (Hrsg.): Comprehensive biotechnology 1985 S. 103-224. Oxford, Pergamon Press.
- [247] *Hahnagerdal, B. and B. Mattiasson*: Azide Sterilization of Fermentation Media - Ethanol-Production from Glucose Using Immobilized *Saccharomyces-Cerevisiae*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 14 (1982) H. 3, S. 140-143.
- [248] *Maioresella, B. L., H. W. Blanch and C. R. Wilke*: Economic-Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes. Biotechnology and Bioengineering 26 (1984) H. 9, S. 1003-1025.
- [249] *Ohta, T., J. C. Ogbonna, H. Tanaka and M. Yajima*: Development of A Fermentation Method Using Immobilized Cells Under Unsterile Conditions .2. Ethanol and L-Lactic Acid Production Without Heat and Filter Sterilization. Applied Microbiology and Biotechnology 42 (1994) H. 2-3, S. 246-250.
- [250] *Hermann, W. O. and W. Haehnel*: Über den Poly-vinylalkohol. Ber.Dtsch.chem.Ges. 60 (1927) S. 1658-1663.
- [251] *Staudinger, H., K. Frey and W. Strarck*: Hochmolekulare Verbindungen, 9. Mitteilung: Über Poly-vinylacetat und Poly-vinylalkohol. Ber.Dtsch.chem.Ges. 60 (1927) S. 1782-1792.
- [252] *Lozinsky, V. I. and F. M. Plieva*: Cell entrapment within PVA-cryogel carrieres: state of art and potentials. Dautzenberg, Horst and Poncelet, Denis. V (1996), S. 13-22. Potsdam. Proceedings of the international workshop Bioencapsulation V.
- [253] *Lozinsky, V. I.*: Cryotropic gelation of poly(vinylalcohol) solutions. Russ.Chem.Rev. 67 (1998) H. 7, S. 573-586.
- [254] *Neukom, H.*: Über Nebenvalenzgele des Polyvinylalkohols. Helv.Chim.Acta 32 (1949) S. 1233-1238.
- [255] Mowiol Polyvinylalkohol. Hoechst High Chem Broschüre (1991) Frankfurt/Main, Hoechst AG.
- [256] *Watase, M., K. Nishinari and M. Nambu*: Anomalous increase of the elastic modulus of frozen poly(vinylalcohol) gels. Cryo-Lett. 4 (1983) S. 197-200.
- [257] *Jekel, M., A. Buhr, T. Willke and K. D. Vorlop*: Immobilization of biocatalysts in LentiKats®. Chemical Engineering & Technology 21 (1998) H. 3, S. 275-+.
- [258] *Vorlop, K. D. and A. Ding*: Gel aus Polyvinylalkohol und Verfahren zu seiner Herstellung. (1995) H. DE 4327923
- [259] *Schick, C.*: A mathematical analysis of foam films. (2004) , S. 1-135. Universität Kaiserslautern.

- [260] *Bolles, W. L.:* The solution of a foam problem. Chem.Eng.Progress 63 (1967) H. 9, S. 48-52.
- [261] *Kouloheris, A. P.:* Foam destruction and inhibition. Chemical Engineering (1970) , S. 143-146.
- [262] *Pahl, H. and D. Franke:* Schaum und Schaumzerstörung - ein Überblick. Chemie-Ingenieur-Technik 67 (1995) H. 3, S. 300-312.
- [263] *Geradi, M. and M. B. Geradi:* Yeast creates a foam problem. Water & Sewage Works (1980) , S. 56-57.
- [264] *Ishida, M., R. Haga, N. Nishimura, H. Matuzaki and R. Nakano:* High cell density suspension culture of mammalian anchorage independent cells: oxygen transfer by gas sparging and defoaming with a hydrophobic net. Cytotechnology 4 (1990) H. 3, S. 215-225.
- [265] *Manegold, E.:* Schaum. (1) Heidelberg: Straßenbau, Chemie und Technik Verlagsgesellschaft m.b. H., 1953
- [266] *Freger, V. B.:* Determination of the foam destruction rate - diffusion of gas. Kolloidnyi Zhurnal 54 (1992) H. 2, S. 162-166.
- [267] *Freger, V. B.:* Determination of the foam destruction rate - rupture of films. Kolloidnyi Zhurnal 54 (1992) H. 2, S. 167-171.
- [268] *Vetoshkin, A. G.:* Estimating the efficiency of an aerodynamic foam breaker. Theoretical Foundations of Chemical Engineering 35 (2001) H. 6, S. 609-613.
- [269] *Monin, D., A. Espert and A. Colin:* A new analysis of foam coalescence: from isolated films to three-dimensional foams. Langmuir 16 (2000) , S. 3873-3883.
- [270] *Vardar-Sukan, F.:* Foaming: consequences, prevention and destruction. Biotechnology Advances 16 (1998) H. 5/6, S. 913-948.
- [271] *Barigou, M.:* Foam rupture by mechanical and vibrational methods. Chem.Eng.Tech. 24 (2001) H. 6, S. 659-663.
- [272] *Morey, M. D., N. S. Deshpande and M. Barigou:* Foam destabilization by mechanical and ultrasonic vibrations. Journal of Colloid and Interface Science 219 (1999) S. 90-98.
- [273] *Schnurmann, R.:* Über die Größe von Gasblasen in Flüssigkeiten. Kolloid.Z. 80 (1937) S. 148-ff.
- [274] *Brauer, H.:* Entwicklung und Erprobung einer Maschine zur mechanischen Schaumzerstörung. Inzyniera Chemiczna I Procesowa 1 (1990) S. 51-74.
- [275] *Lohmann, T. and M. H. Pahl:* Phänomene bei der Schaumzerstörung durch Beregnen. Aufbereitungs-Technik 34 (1993) H. 7, S. 347-354.
- [276] *Lohmann, T. and M. H. Pahl:* Mechanische Schaumzerstörung feststoffhaltiger Schäume. Chemie-Ingenieur-Technik 56 (1993) H. 11, S. 1362-1365.

- [277] *Lohmann, T.*: Mechanische Schaumzerstörung durch Beregnen. (1994) S. 1-162. Universität Gesamthochschule Paderborn.
- [278] *Pahl, M. H. and H. Meinecke*: Schaumzerstörung mit arteigener Flüssigkeit. (1989) H. 114, S. 433-459. Weinheim, Verlag Chemie.
- [279] *Vauck, W. R. A. and H. A. Müller*: Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik. (11) Stuttgart: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 2000
- [280] *Barnett, J. A. and A. P. Sims*: A note on the kinetics of uptake of D-glucose by the food yeast, *Candida utilis*. Archives of Microbiology 111 (1976) H. 1-2, S. 193-194.
- [281] *Ota, A.*: Glucose uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios 73 (1993) H. 296, S. 199-203.
- [282] *Rossell, S., C. C. van der Weijden, A. Kruckeberg, B. M. Bakker and H. V. Westerhoff*: Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. Mol.Biol.Rep. 29 (2002) H. 1-2, S. 255-257.
- [283] *Aldiguier, A. S., S. Alfenore, X. Cameleyre, G. Goma, J. L. Uribelarrea, S. E. Guillouet and C. Molina-Jouve*: Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. Bioprocess and Biosystems Engineering 26 (2004) H. 4, S. 217-222.
- [284] *Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S. E. Guillouet, J. L. Uribelarrea, G. Goma and L. Benbadis*: Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology 60 (2002) H. 1-2, S. 67-72.
- [285] *Birol, G., Z. I. Önsan, B. Kirdar and S. G. Oliver*: Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch. Enzyme and Microbial Technology 22 (1998) H. 8, S. 672-677.
- [286] *Borzani, W.*: Variation of the ethanol yield during oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17 (2001) H. 3, S. 253-258.
- [287] *Guenette, M. and Z. Duvnjak*: Wood blocks as a carrier for *Saccharomyces cerevisiae* used in the production of ethanol and fructose. Chem.Eng.J.Biochem.Eng.J. 61 (1996) H. 3, S. 233-240.
- [288] *Krishnan, M. S., Y. Xia, G. T. Tsao, N. Kasthurikrishnan, N. Srinivasan and R. G. Cooks*: Process Engineering of High-Ethanol-Tolerance Yeast for the Manufacture of Ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology 51-2 (1995) S. 479-493.
- [289] *Toivari, M. H., A. T. Aristidou, L. Ruohonen and M. Penttilä*: Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of

xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. *Metabolic Engineering* 3 (2001) H. 3, S. 236-249.

- [290] *Connstein, W. and K. Lüdecke*: Über Glycerin-Gewinnung durch Gärung. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 52 (1919) H. 2, S. 1385-1391.
- [291] *Kalle, G. P. and S. C. Naik*: Continuous fed-batch vacuum fermentation system for glycerol from molasses by the sulfite process. *Journal of Fermentation Technology* 63 (1985) H. 4, S. 411-414.
- [292] *Kalle, G. P. and S. C. Naik*: Effect of controlled aeration on glycerol production in a sulfite process by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 29 (1987) H. 9, S. 1173-1175.
- [293] *Kalle, G. P., S. C. Naik and B. Z. Lashkari*: Improved glycerol production from cane molasses by the sulfite process with vacuum or continuous carbon-dioxide sparging during fermentation. *Journal of Fermentation Technology* 63 (1985) H. 3, S. 231-237.
- [294] *Baganz, K.*: Informationsgespräch. (2005)
- [295] *Wagner, W.*: Planung im Anlagenbau. (2) Würzburg: Vogel Industrie Medien, 2003
- [296] *Wach, W.*: Informationsgespräch. (2005)